

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE
LOS ALIMENTOS



TESIS DOCTORAL

**Estudio de las propiedades tecnológicas de bacterias aisladas
de leche materna:**

aplicación para el desarrollo de alimentos funcionales

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Nivia Cárdenas Cárdenas

Directores

Juan Miguel Rodríguez Gómez
Leónides Fernández Álvarez

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE
LOS ALIMENTOS



TESIS DOCTORAL

**Estudio de las propiedades tecnológicas de bacterias aisladas
de leche materna:**

aplicación para el desarrollo de alimentos funcionales

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Nivia Cárdenas Cárdenas

Directores

Juan Miguel Rodríguez Gómez
Leónides Fernández Álvarez

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA
Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES TECNOLÓGICAS DE
BACTERIAS AISLADAS DE LECHE MATERNA. APLICACIÓN
PARA EL DESARROLLO DE ALIMENTOS FUNCIONALES**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Nivia Cárdenas Cárdenas

Bajo la dirección de los doctores

Juan Miguel Rodríguez Gómez
Leónides Fernández Álvarez

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA
Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES TECNOLÓGICAS DE BACTERIAS
AISLADAS DE LECHE MATERNA. APLICACIÓN PARA EL DESARROLLO
DE ALIMENTOS FUNCIONALES**

Memoria que para optar al grado de
Doctor, presenta la Licenciada Nivia
Cárdenas Cárdenas

Madrid, 2015



Departamento de Nutrición, Bromatología
y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Veterinaria

Ciudad Universitaria s/n. 28040 Madrid
Teléfono: 91 394 3749. Fax: 91 394 3743

JUAN MIGUEL RODRÍGUEZ GÓMEZ Y LEÓNIDES FERNÁNDEZ ÁLVAREZ,
PROFESORES TITULARES DE UNIVERSIDAD, DEL DEPARTAMENTO DE
NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA
FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE
MADRID,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Estudio de las propiedades tecnológicas de bacterias aisladas de leche materna. Aplicación para el desarrollo de alimentos funcionales”, de la que es autora la Licenciada Nivia Cárdenas Cárdenas, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección conjunta de los que suscriben, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

Madrid, 24 de marzo de 2015

Los Directores de la Tesis Doctoral,

Juan Miguel Rodríguez Gómez

Leónides Fernández Álvarez

A la memoria de mis abuelos

A mis padres

A mi esposo

Al culminar una etapa tan importante como la realización de una Tesis Doctoral y mirar hacia atrás parece increíble, pero si finaliza satisfactoriamente es gracia a la contribución de personas a las que quisiera agradecer:

A los directores del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria durante el período de realización de esta Tesis Doctoral, Lorenzo de la Hoz Perales y María Dolores Selgas Cortecero, por aceptarme en este Departamento.

A mis directores de Tesis Juan Miguel Rodríguez y Leónides Fernández, personas maravillosas que admiro y respeto por su sabiduría dedicación y humildad y por quienes siento un cariño infinito. Juan gracias por contagiarme con esa pasión que sientes por la investigación, por formarme, por tu preocupación por todos mis problemas y sacar tiempo para ayudarme en lo que fuera necesario, por hacerme sonreír hasta en los días más difíciles. Leo no tengo palabras para agradecerte todo lo que haces por mí, gracias por tu apoyo incondicional en mi vida profesional y personal, por enseñarme y cuidarme tanto, por esa paciencia y ternura con la que siempre me tratas, más que mi tutora te has convertido en una segunda madre.

Quiero dar las gracias al grupo de investigación PROBILAC/ PROBISEARCH del que me siento muy orgullosa de formar parte. A todas las personas con las que he compartido alguna etapa de esta Tesis y que han contribuido en mi formación y que siempre me han hecho sentir en casa. A Esther, gracias por estar dispuesta a enseñarme todo en el laboratorio, a María por siempre tratarme con tanto cariño, a Irene, a Marta por buscar soluciones a mis temas de papeles tan complicados, a Susana, a Rebeca, gracias por tu amistad incondicional por enseñarme tanto de identificación de microorganismos por ser tal linda y cariñosa, a Virginia con quien es muy agradable trabajar y de la que he aprendido mucho y con quien comparto ahora esta nueva etapa de mamá, a Laura por ser mi amiga, siempre dispuesta a ayudarme en lo que fuera necesario y por los momentos divertidos que hemos pasado juntas, a Aranxa por su dulzura y amistad. A Elena y Raquel, que a pesar del poco tiempo que coincidimos han marcado mi vida.

A todos en el departamento por la amabilidad con la que me han tratado siempre.

Al grupo de Margarita Medina en especial a Ángela y Javier por su colaboración para la determinación de los volátiles siempre dispuestos a ayudarme en lo que fuera necesario.

A la Agencia Internacional de Cooperación y Desarrollo (AECID) por otorgarme la beca para la realización de esta Tesis.

A mis amigos del colegio mayor Gilberto, Humberto y Mariela que fueron fundamental en esos primeros años, donde todo era nuevo para nosotros, por todo lo que aprendimos juntos y los buenos momentos compartidos.

A mis compis de Homologación Marcela Carmen y Verónica, con las que pasé muchos días de estudio y que hoy son mis amigas, Marce muchas gracias por tu

alegría y sentir mis logros como tuyos. Vero gracias por todo el tiempo que hemos compartimos y por estar pendiente de la Tesis y animarme siempre.

A los profesores de la universidad de la Habana en la que estudié y mis compañeros del Departamento de química básica con los que compartí mis primeros años de trabajo. Ellos me animaron a que me superara y realizara esta Tesis.

A Nairobi y Tania por su amistad quienes a pesar de la distancia siempre han estado pendiente de la Tesis.

A toda mi familia por su preocupación y apoyo. A mis abuelos por su ternura y cuidarme tanto. A mis padres que siempre se han sacrificado para ver este sueño hecho realidad por formarme como ser humano. A mi papá por siempre exigirme que intentara ser mejor cada día. A mi madre que sé que quisiera estar en este momento y que siempre está al tanto de mí que me quiere y que se ha desvelado tanto por esta Tesis, estoy muy orgullosa de ti, eres la mejor madre del mundo. A mis suegros, Maida y Lorenzo por su preocupación y apoyo en todo momento a Elda por su cariño.

A mi esposo por su paciencia por esperarme tantos años, por su amor incondicional, siempre animándome en todo, por las horas que ha dedicado a esta Tesis y por contagiarme con tu optimismo, gracias a ti cada día soy más feliz.

A todos Muchas gracias!

RESUMEN / SUMMARY

RESUMEN

Las bacterias lácticas (BAL) son, tanto desde el punto de vista filogenético como fenotípico y ecológico, un grupo heterogéneo de microorganismos que comparten la capacidad de producir ácido láctico como principal producto final del metabolismo de azúcares. Se encuentran en muy diferentes hábitats, que se caracterizan por ser ricos en nutrientes. Las bifidobacterias, aunque no tienen una relación filogenética muy estrecha con las BAL, suelen compartir algunos nichos ecológicos, especialmente los hospedadores animales.

Las BAL tienen una gran importancia económica por son las más frecuentemente usadas en la fermentación de alimentos, principalmente en la producción de productos lácteos. La rápida producción de ácidos orgánicos, el consumo de nutrientes presentes en la leche y/o la producción de varios compuestos antimicrobianos, como las bacteriocinas, tienen un efecto conservador ya que controla el crecimiento de microorganismos alterantes. Además, las BAL utilizadas como cultivos iniciadores y/o adjuntos también contribuyen al desarrollo de aroma, sabor y textura adecuados en el producto final. Por otra parte, durante siglos, muchas cepas de BAL y *Bifidobacterium* se han asociado con un efecto beneficioso para la salud ligado al consumo de productos lácteos fermentados y son bien conocidas por sus características probióticas. Sin embargo, los mecanismos moleculares que contribuyen al carácter probiótico no se conocen completamente.

En las últimas décadas, la leche humana ha sido reconocida como una importante fuente de bacterias viables que parecen estar especialmente adaptadas para residir en el tracto gastrointestinal humano el intestino del recién nacido e interactuar con los humanos inmediatamente después de su nacimiento. Las principales bacterias que se encuentran en la leche materna son estafilococos y estreptococos, pero también contiene BAL y bifidobacterias. Algunos lactobacilos aislados de la leche humana han sido caracterizados y se ha demostrado que tienen un buen potencial probiótico. De hecho, ha habido un gran interés en la selección de cepas de lactobacilos y bifidobacterias potencialmente probióticas a partir de este fluido biológico. Por lo tanto, los objetivos de esta Tesis Doctoral fueron evaluar algunas propiedades de relevancia tecnológica en una colección de BAL y bifidobacterias aisladas de leche humana, buscar correlaciones entre las características fenotípicas y la información contenida en su genoma y, por último, determinar el comportamiento de algunas de estas cepas en productos lácteos fermentados..

Los resultados obtenidos al ensayar algunas propiedades tecnológicas relevantes en una colección de 36 cepas de BAL y bifidobacterias aisladas de leche humana revelaron que todas ellas producían pequeñas cantidades de ácido y tenían escasa actividad proteinasa cuando se comparaban con otras cepas aisladas de productos fermentados lácteos comerciales. Algunas cepas de *Streptococcus salivarius*

y *Lactobacillus salivarius* exhibieron una intensa actividad aminopeptidásica; solo los estreptococos y las cepas de *Lactobacillus gastricus* mostraron actividad con los sustratos utilizados para ensayar la actividad esterásica.

Asimismo, se investigó el potencial de aplicación en la industria láctea de una colección de cepas de *L. gastricus* aisladas de leche humana. Sus actividades acidificante y proteolítica fueron escasas, confirmando los resultados obtenidos previamente en esta Tesis Doctoral. En cambio, algunas cepas destacaron por su elevada actividad aminopeptidásica frente al sustrato Gly-Pro-pNA, la cual se ha relacionado con la capacidad para hidrolizar oligopéptidos ricos en prolina que son responsables de amargor en productos lácteos. Estas cepas mostraron potencial para colonizar el tracto gastrointestinal (en función de su actividad antimicrobiana, la supervivencia a las condiciones imperantes en el tracto gastrointestinal y su adhesión *in vitro* a mucus), no tuvieron rasgos indeseables (producción de aminas biógenas, ácido D(-)-láctico, actividad β -glucuronidasa) y fueron estables cuando se emplearon las técnicas de conservación tradicionales en la industria para los cultivos bacterianos. La disponibilidad de la secuencia genómica completa de una de las cepas de *L. gastricus* permitirá en el futuro explorar su potencial como cultivo funcional.

Se encontró una Buena concordancia entre las propiedades fenotípicas y la información genética contenida en el cromosoma de *Lactobacillus fermentum* CECT 5716. Algunas características fenotípicas interesantes, como la actividad α -galactosidasa, la producción de glutatión, la biosíntesis de folato y riboflavina y la susceptibilidad a los antibióticos, se comprobó que estaban respaldadas por la presencia (o ausencia en el caso de las resistencias a antibióticos) de genes o grupos de genes en el cromosoma de *Lactobacillus fermentum* CECT 5716. Esta aproximación abre nuevas opciones para evaluar e investigar nuevas cepas probióticas y permite comprender los mecanismos que subyacen a los beneficios para la salud.

Se ha confirmado que el queso fresco es un buen vehículo para los probióticos *L. salivarius* CECT 5713 y PS2. Ambas cepas se mantuvieron viables en los quesos experimentales después de un almacenamiento de 28 días a 4°C, manteniéndose la calidad microbiológica del queso. Los recuentos de *L. salivarius* CECT 5713 y PS2 en las muestras de queso tomadas regularmente estuvieron siempre en el rango de los niveles recomendados para probióticos en productos alimenticios. Además, no interfirieron con la actividad del cultivo iniciador empleado para la elaboración del queso y la composición química del queso no se modificó sustancialmente. La aceptación global de los quesos elaborados con *L. salivarius* CECT 5713 y PS2 por parte de jueces semientrenados fue buena.

Los enterococos se aíslan frecuentemente de productos lácteos en los que contribuyen a la maduración del queso y al desarrollo del sabor y aroma. En este trabajo, por último, se evaluaron algunas propiedades tecnológicas importantes para la

industria láctea en *Enterococcus faecium* LJx4, una cepa segura aislada de leche humana, para investigar si poseía características distintivas. *E. faecium* LJx4 mostró escasas producción de ácido y actividad proteolítica, pero modificó el perfil de los compuestos volátiles en queso y demostró tener acción bacteriostática frente a *Listeria innocua* SA1. Estos resultados demuestran que *E. faecium* LJx4 podría emplearse en la industria láctea como cultivo adjunto y/o bioprotector.

SUMMARY

Lactic acid bacteria (LAB) can be considered, phylogenetically, phenotypically and ecologically, a heterogeneous group of microorganisms that share the metabolic capability of producing lactic acid as the end product after the fermentation of sugars. They are found in a wide variety of habitats, usually characterized as being rich in nutrients. Bifidobacteria, although they do not share a tight phylogenetic relationship with LAB, are usually found in some habitat where it is common to find LAB, especially in animal hosts.

LAB have a great economic importance because they are the most frequently used bacteria in food fermentations, mainly in the production of dairy products. The fast production of organic acids, the consumption of nutrients in milk and/or the production of different antimicrobial compounds, such as bacteriocins, have a preservative effect by controlling the growth of spoilage microorganisms. Furthermore, LAB used as starter and/or adjunct cultures also contribute to flavor and texture development in the final product. In addition, LAB and *Bifidobacterium* strains have been associated for centuries with health benefits linked to the consumption of fermented milk products and are well known for their probiotic characteristics. However, the molecular mechanisms that contribute to the probiotic character are not completely understood.

In the last decades, human milk has been recognized as a source of live bacteria that seem to be uniquely adapted to reside in the human digestive tract and to interact with humans right after birth. Staphylococci and streptococci are the main bacteria found in human milk, but it also contains LAB and bifidobacteria. Some lactobacilli isolated from human milk have been characterized and shown to have probiotic potential. In fact, a great interest has been focused on the selection of potentially probiotic lactobacilli and bifidobacterial strains from this biological fluid. Therefore, the objectives of this Thesis were to evaluate some properties of technological relevance in a collection of LAB and bifidobacteria isolated from human milk, to find correlations between phenotypic characteristics and genomic information, and to ascertain the performance of some of these strains in dairy fermented products.

The results obtained after testing some technological relevant properties in a collection of 36 strains of LAB and bifidobacteria isolated from human milk revealed a low acid producing and proteinase activity when compared to other strains isolated from commercial dairy fermented products. Some *Streptococcus salivarius* and *Lactobacillus salivarius* strains exhibited intense aminopeptidase activity; only streptococci and *Lactobacillus gastricus* showed activity with esterase substrates.

The potential application in the dairy industry of a collection of *L. gastricus* strains isolated from human milk was investigated. Their acidifying and proteolytic activity in milk was scarce, confirming the results obtained previously in this Thesis.

However, some strains displayed high aminopeptidase activity targeting Gly-Pro-pNA, which has been related to the ability to hydrolyze proline-rich oligopeptides related to bitterness in dairy products. These strains got potential to colonize the gastrointestinal tract (based on its antimicrobial activity, survival in the presence of bile salts and adhesion to mucus *in vitro*), did not display undesirable traits (production of biogenic amines, D(-)-lactate, β -glucuronidase activity) and was stable using traditional preservation technologies for industrial bacterial cultures. The availability of the complete genome sequence of one of the *L. gastricus* strains would allow in the future to explore its potential as a functional culture.

A good agreement was found between phenotype properties and chromosomal genetic information in *Lactobacillus fermentum* CECT 5716. Some interesting phenotypic characteristics such as α -galactosidase activity, glutathione production, biosynthesis of folate and riboflavin, and susceptibility to antibiotics were backed by genes or genes clusters present (or absent, in relation to susceptibility to antibiotics) in *L. fermentum* CECT 5716 chromosome. This approach widens the options for the evaluation and search for novel probiotic strains or to understand the mechanisms behind health benefits.

Fresh cheese has been confirmed to be a good carrier for probiotic *L. salivarius* CECT 5713 and PS2. Both strains remained viable in the experimental cheeses after 28 days at 4°C and the microbiological quality of the cheese was maintained. The bacterial counts of *L. salivarius* CECT 5713 and PS2 in cheeses were always in the range of recommended levels for probiotics in food products. Furthermore, they did not interfere with the starter culture used in cheesemaking, and cheese chemical composition was not modified substantially. The global acceptance of the cheeses manufactured with *L. salivarius* CECT5713 and PS2 was good as assessed by semi-trained panellists.

Enterococci are frequently isolated from dairy products where they contribute to cheese ripening and flavor development. Technological properties relevant to dairy industry were evaluated in *Enterococcus faecium* LJx4, a safe strain isolated from human milk, in order to investigate potential distinct characteristics. *E. faecium* LJx4 displayed poor acidifying and proteolytic activities, but modified the volatile profile in cheese and showed bacteriostatic action against *Listeria innocua* SA1. These results indicate that *E. faecium* LJx4 could be useful in dairy industry as adjunct and/or bioprotective culture

ÍNDICE

	Página
I. Exposición general del tema a investigar	1
II. Introducción general	5
II.1. Las bacterias lácticas	7
II.1.1. El género <i>Lactobacillus</i>	14
II.1.1.1. Filogenia del género <i>Lactobacillus</i>	15
II.1.1.2. Principales métodos de identificación de <i>Lactobacillus</i>	17
II.1.1.3. Nichos ecológicos del género <i>Lactobacillus</i>	22
II.1.2. El género <i>Enterococcus</i>	25
II.1.2.1. Filogenia del género <i>Enterococcus</i>	26
II.1.2.2. Los enterococos como comensales	27
II.1.2.3. Los enterococos en alimentos	28
II.1.2.4. Comensales y patógenos	30
II.1.2.5. Resistencia a antibióticos	33
II.1.2.6. Los enterococos como probióticos	37
II.2. Las bacterias lácticas en los productos lácteos fermentados	40
II.2.1. Cultivos iniciadores	41
II.2.2. Cultivos adjuntos o secundarios	43
II.2.3. Probióticos	43
II.2.4. Metabolismo de la lactosa	46
II.2.5. Sistema proteolítico de las BAL	50
II.2.6. Formación de compuestos aromáticos y sápidos	54
II.2.7. Control de otros microorganismos	59
II.2.8. Aminas biógenas	62
II.2.9. Preparación industrial de los cultivos iniciadores	63
II.3. La leche humana como fuente de probióticos	67
II.3.1. Composición bacteriológica de la leche humana	67
II.3.2. Origen de las bacterias presentes en la leche humana	73
II.3.3. Funciones de la microbiota de la leche materna	75
II.3.4. Propiedades probióticas de las bacterias aisladas de la leche materna	76
II.4. El queso	80
II.4.1. Definición y clasificación	81
II.4.2. Tecnología de elaboración del queso	83
II.4.2.1. Estandarización de la leche	83
II.4.2.2. Coagulación	84
II.4.2.3. Desuerado	85
II.4.2.4. Salado	85
II.4.2.5. Maduración o afinado	86

II.4.3. Cambios bioquímicos durante la maduración de los quesos	87
II.4.3.1. Metabolismo de la lactosa residual y de lactato y citrato	87
II.4.3.2. Lipolisis	88
II.4.3.3. Proteolisis	89
II.4.4. El queso como vehículo de probióticos	90
III. Propiedades de interés tecnológico de una colección de BAL y bifidobacterias aisladas de leche humana	93
III.1. Abstrac	95
III.2. Introduction	96
III.3. Material and Methods	98
III.3.1. Bacterial strains and growth conditions	98
III.3.2. Acidifying capacity	98
III.3.3. Proteolytic activity	98
III.3.4. Peptidase and esterase activities	99
III.3.5. Statistical analysis	99
III.4. Results	101
III.4.1. Acidifying activities	101
III.4.2. Proteolytic activities	101
III.4.3. Peptidase activities	102
III.4.4. Esterase activities	102
III.4.5. Global analysis of technological properties	103
III.5. Discussion	104
III.6. References	107
IV. Caracterización de una colección <i>Lactobacillus gastricus</i> aislados de leche materna	121
V. Secuenciación del genoma de <i>Lactobacillus gastricus</i> PS3, una cepa aislada de leche humana	135
VI. Relación entre el genoma y algunas propiedades fenotípicas <i>Lactobacillus fermentum</i> CECT 5716, una cepa probiótica aislada de leche humana	139
VII. Desarrollo de un queso fresco probiótico mediante el empleo de dos cepas de <i>Lactobacillus salivarius</i> aisladas de leche humana	153
VIII. Potencial de <i>Enterococcus faecium</i> LJx4, una cepa aislada de leche humana, para la industria láctea	167
VIII.1. Abstract	169
VIII.2. Introduction	170
VIII.3. Materials and methods	171
VIII.3.1. Bacterial strains and culture conditions	171
VIII.3.2. Acidifying activity	172
VIII.3.3. Proteolytic activity	172
VIII.3.4. Aminopeptidase, esterase, and lipase activities	172
VIII.3.5. Post-electrophoretic detection of intracellular esterases	173

VIII.3.6. Experimental model cheese manufacture	173
VIII.3.7. Analysis of volatile compounds	173
VIII.3.8. Anti- <i>Listeria</i> activity of <i>E. faecium</i> LJx4 in vitro	173
VIII.3.9. Inhibition of <i>L. innocua</i> SA1 by <i>E. faecium</i> LJx4 in model fermented milk	174
VIII.3.10. Inhibition of <i>L. innocua</i> SA1 by <i>E. faecium</i> LJx4 in model cheese	174
VIII.3.11. Statistical analysis	175
VIII.4. Results	175
VIII.4.1. Acidifying activity: titratable acidity and pH	175
VIII.4.2. Proteolytic and aminopeptidase activities	175
VIII.4.3. Esterase and lipase activities	176
VIII.4.4. Volatile analysis	177
VIII.4.5. Anti- <i>Listeria</i> activity in vitro	177
VIII.4.6. Control of <i>L. innocua</i> SA1 in model fermented milk	177
VIII.4.7. Control of <i>Listeria</i> in a cheese model	177
VIII.5. Discussion	178
VIII.6. Conclusion	181
VIII.7. References	181
IX. Discusión general	197
IX.1 Potencial tecnológico de una colección de bacterias aisladas de leche humana	199
IX.2 <i>L. gastricus</i> , un nuevo actor en la industria láctea	202
IX.3 <i>L. fermentum</i> CECT 5716: acuerdo entre el genoma y algunas propiedades fenotípicas	206
IX.4 El queso como vehículo para la administración de <i>L. salivarius</i> probióticos	210
IX.5 Potencial de <i>E. faecium</i> LJx4, una cepa aislada de leche humana, para la industria láctea	213
X. Conclusiones	217
XI. Bibliografía	221
XII. Resumen ampliado	251
XII.1 Introducción	253
XII.2 Objetivos	255
XII.3 Material y Métodos	256
XII.4 Resultados	261
XII.5 Discusión	265
XII.6 Conclusiones	272
XII.7 Referencias	273
XIII. Extended abstract	281
XIII.1 Introduction	283
XIII.2 Objectives	285

XIII.3 Material and methods	286
XIII.4 Results	291
XIII.5 Discussion	295
XIII.6 Conclusions	301
XIII.7 References	302

I. EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR

Las bacterias lácticas constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos con un gran interés económico debido a su aplicación en la industria alimentaria para la obtención de numerosos productos fermentados, entre los que destacan los productos lácteos. Por otra parte, este grupo de bacterias también está muy adaptado a otros nichos ecológicos que se caracterizan por su riqueza en nutrientes, como son las mucosas de los tractos digestivo y vaginal de numerosas especies animales (Douillard y de Vos, 2014).

El principal papel que tienen las bacterias lácticas durante la elaboración de los productos lácteos fermentados es la rápida producción de ácido, provocando notables cambios en la textura de los productos y contribuyendo al control de los microorganismos que pudieran encontrarse en la materia prima (Carr *et al.*, 2002). Además, las bacterias lácticas empleadas como cultivo iniciador o cultivos adjuntos también contribuyen al desarrollo del sabor y aroma adecuados en el producto final (Reginensi *et al.*, 2012). Por otra parte, en los últimos años está creciendo el interés por las bacterias que proporcionan un beneficio para la salud, en especial por parte del sector lácteo. Las especies más demandadas y estudiadas pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, cuyo consumo a través de productos lácteos se ha asociado durante siglos con un efecto positivo para la salud (Aureli *et al.*, 2011).

La leche humana es una de las fuentes de bacterias comensales y probióticas que contribuyen a la colonización y modulación del intestino del lactante (Fernández *et al.*, 2013). Aunque los géneros mayoritarios son *Staphylococcus* y *Streptococcus*, también pueden encontrarse con cierta frecuencia bacterias de diversas especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Heikkilä y Saris, 2003; Jiménez *et al.*, 2008; Martín *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2009). Estas bacterias no solo están adaptadas al ambiente lácteo, sino que también parecen estarlo para residir en el tracto gastrointestinal humano e interactuar con él (Jeurink *et al.*, 2013). Por ello, en los últimos años se ha constatado un gran interés en la selección y caracterización de bacterias potencialmente probióticas a partir de este fluido biológico.

En este contexto, los objetivos de esta Tesis Doctoral fueron:

1. Evaluar algunas propiedades de interés tecnológico en una colección de bacterias lácticas y bifidobacterias aisladas de leche de mujeres sanas con el fin de utilizarlas para el desarrollo de nuevos productos fermentados.

2. Caracterizar una colección de cepas de *Lactobacillus gastricus* aisladas de leche humana, dada la ausencia de información disponible sobre esta especie bacteriana. Evaluar varias propiedades de interés tecnológico (capacidad de crecer en leche, actividad acidificante, actividad proteásica, peptidásica y esterásica), potencialmente probióticas (potencial antimicrobiano, supervivencia a condiciones similares a las existentes en el tracto gastrointestinal), relacionadas con su seguridad

(producción de aminas biógenas, resistencia a antimicrobianos) y estabilidad durante el almacenamiento en refrigeración, congelación y liofilización.

3. Secuenciar y anotar la secuencia genómica de *Lactobacillus gastricus* PS3, una de las cepas aisladas de leche humana, para obtener más información sobre su aptitud tecnológica y posibles propiedades beneficiosas.

4. Relacionar algunas características fenotípicas de *Lactobacillus fermentum* CECT 5716, una cepa aislada originalmente de leche humana y que ya ha encontrado aplicaciones comerciales por su carácter probiótico, con la información genética codificada en su cromosoma.

5. Determinar la aptitud de dos cepas de *Lactobacillus salivarius* (CECT 5713 y PS2), aisladas previamente de leche materna y con un interesante potencial probiótico, para desarrollar un queso probiótico. Para ello, se ha de conocer si tienen una supervivencia satisfactoria a lo largo de todo el proceso de producción y almacenamiento del queso y si producen cambios en sus características químicas y organolépticas que alteren su aceptación por parte del consumidor.

6. Evaluar la utilidad de *Enterococcus faecium* LJx4, otra cepa aislada de leche humana, como cultivo iniciador o adjunto en la elaboración de productos lácteos fermentados. Para ello se han de determinar algunas propiedades de interés tecnológico, el impacto en el perfil de compuesto volátiles de dichos productos y su contribución a la seguridad microbiológica del producto fermentado.

II. INTRODUCCIÓN

II.1. LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacterias lácticas (BAL) son, tanto desde un punto de vista filogenético como fenotípico y ecológico, un grupo heterogéneo de microorganismos que tienen en común la capacidad de generar ácido láctico como principal producto final de la fermentación de carbohidratos. El origen microbiano de esta fermentación láctica fue reconocido por Louis Pasteur en 1857. Años más tarde (1873), Joseph Lister aisló de leche un microorganismo que denominó *Bacterium lactis* (Stiles y Holzapfel, 1997). Con el paso del tiempo, las BAL se han encontrado en muy diferentes hábitats, todos ellos ricos en nutrientes. Están habitualmente en alimentos de origen animal y vegetal, entre los que cabe destacar la leche, la carne y los cereales, y juegan un papel primordial en la obtención de sus derivados fermentados, razón por la cual son el grupo bacteriano con mayor importancia industrial (Caplice y Fitzgerald, 1999). También se hallan con frecuencia en el ambiente, principalmente en el suelo y las aguas residuales (Holzapfel *et al.*, 2001). Además, forman parte de la microbiota asociada a las mucosas en el hombre y otras especies animales (Kostic *et al.*, 2013).

El término BAL no se corresponde con ninguna división filogenética. El concepto de BAL como grupo se desarrolló a principios del siglo XX, basándose en estudios científicos y el desarrollo técnico logrado en los últimos años del siglo XIX (Stiles y Holzapfel, 1997). De hecho, dentro de las BAL se agrupan microorganismos con distintas características que, en su mayoría, presentan un contenido en G+C inferior al 50% (Figura 1). En general, son microorganismos Gram-positivos y anaerobios facultativos, que no forman esporas y son tolerantes al ácido.

En este grupo se incluyen muchos géneros bacterianos, aunque el interés científico y comercial se centra en siete de ellos pertenecientes a las familias *Lactobacillaceae* (géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*), *Leuconostocaceae* (géneros *Oenococcus* y *Leuconostoc*), *Enterococcaceae* (género *Enterococcus*) y *Streptococcaceae* (géneros *Lactococcus* y *Streptococcus*). Pueden tener forma bacilar o cocoide y las células encontrarse aisladas o dispuestas en parejas, tétradas o formando cadenas de longitud variable.

Un rasgo clave de las bacterias lácticas es su incapacidad de sintetizar porfirinas y, por lo tanto, grupos hemo, por lo que carecen de citocromos. Al no existir un sistema de cadena de transporte de electrones, la generación de la energía tiene lugar mediante fermentación, es decir, fosforilaciones a nivel de sustrato (Khalid, 2011). Sin embargo, la especie *Lactococcus lactis* es capaz de cambiar el metabolismo fermentativo a oxidativo cuando existe hemo en el medio mediante la activación de una cadena de transporte de electrones. Este cambio es muy ventajoso a nivel industrial porque permite aumentar notablemente la producción de biomasa bacteriana y mejorar la viabilidad celular (Duwat *et al.*, 2001; Rezaiki *et al.*, 2004). Otros géneros del grupo de las BAL (*Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus*) también tienen la

capacidad de respirar aeróbicamente cuando disponen de hemo y/o metaquinona en el medio, obteniendo igualmente mayor rendimiento de biomasa y resistencia celular (Pedersen *et al.*, 2012).

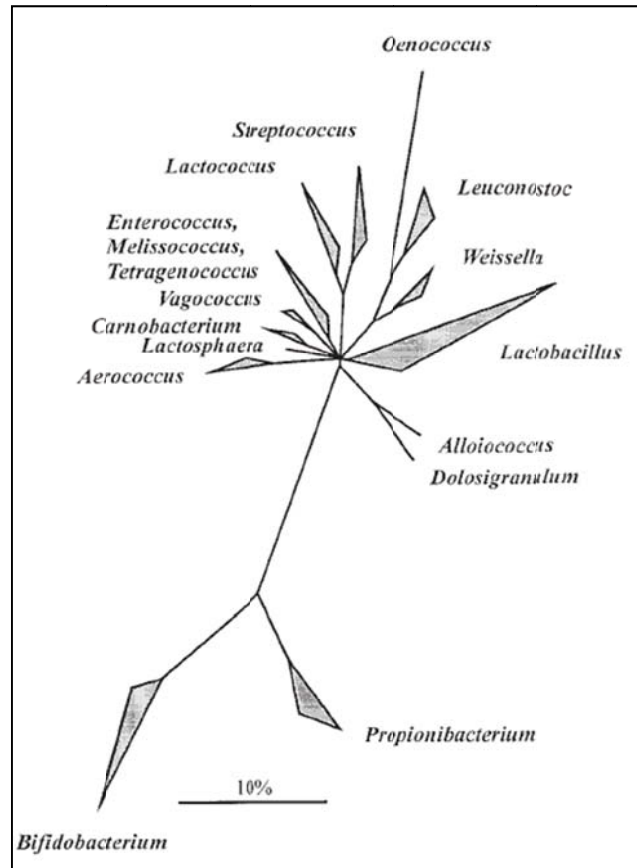


Figura 1. Árbol filogenético de los principales géneros del grupo de las bacterias lácticas basado en la comparación de las secuencias del gen 16S rDNA. Fuente: Holzapfel (2001).

Las BAL carecen de una verdadera catalasa, aunque algunos lactobacilos descomponen el peróxido mediante una pseudocatalasa que no contiene un grupo hemo (Beyer y Fridovich, 1985). La mayoría de las BAL son anaerobias pero, a diferencia de la mayoría de los microorganismos anaerobios, pueden crecer en presencia de oxígeno como anaerobios aerotolerantes gracias a la posesión de peroxidasas (Holzapfel, 1997; Axelsson, 2004; Khalid, 2011; Doyle, 2013). La producción de pigmentos en este grupo es rara aunque algunas especies presentan coloración amarilla, naranja o parda.

Las bifidobacterias son microorganismos Gram-positivos y productores de ácido láctico, aunque siempre lo hacen en combinación con el ácido acético. Sin embargo, el género *Bifidobacterium*, que tiene un contenido en G+C superior al 50%, es muy

diferente al resto de los géneros considerados dentro de las BAL (Figura 1). En primer lugar, las bifidobacterias tienen una ruta especial y característica del género *Bifidobacterium* para fermentar las hexosas denominada ruta de la frutosa-6-fosfato, ya que carecen de las enzimas aldolasa (típica de la glucólisis) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (característica de la ruta de las hexosas monofosfato) que están presentes en otros géneros de las BAL (de Vries y Stouthamer, 1867). La composición de la pared celular de las bifidobacterias también es distinta y se encuentra más próxima a *Actinomyces*. De hecho, el análisis filogenético de las secuencias de RNA ribosómico confirma la pertenencia de las bifidobacterias al filo *Actinobacteria*, mientras que el resto de los géneros incluidos en el grupo de las BAL están adscritos al filo *Firmicutes* (Figura 2). A diferencia del resto de las BAL, las bifidobacterias se encuentran asociadas casi exclusivamente con hospedadores animales. A pesar de todo, por sus características fenotípicas y funcionales, así como por su importante papel en el equilibrio de la microbiota intestinal ha sido muy habitual en el pasado incluirlas dentro de las BAL (Ludwig y Klenk, 2001).

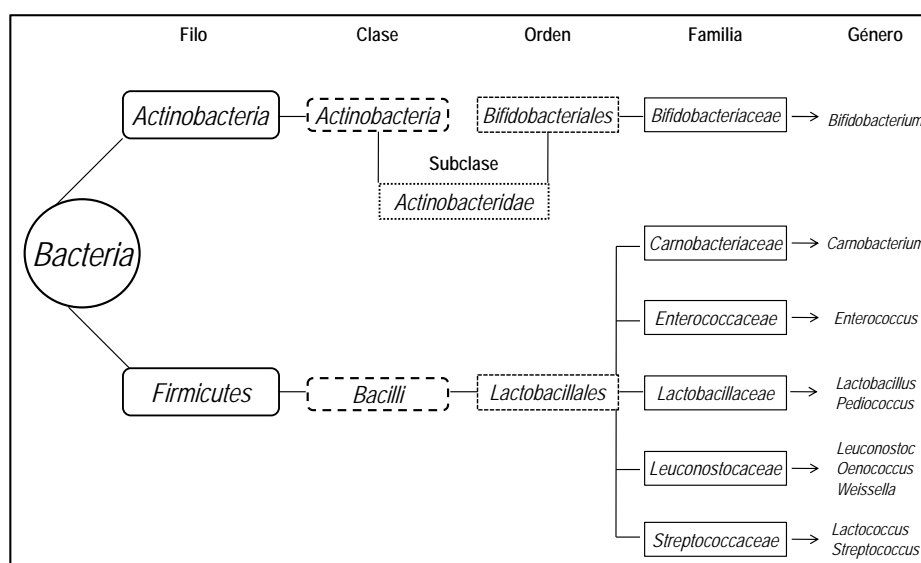


Figura 2. Clasificación taxonómica de las bacterias lácticas. Según información tomada de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/>.

La gran diversidad observada dentro de las BAL probablemente sea consecuencia de las complejas interacciones que han establecido a lo largo del tiempo con los hábitats en los que se encuentran, como se refleja en la Figura 3. Las BAL son heterótrofas y es muy probable que establecieran inicialmente una estrecha relación con la materia vegetal y, después, con los animales, incluyendo el hombre. A pesar del interés que ha despertado su relación con el organismo humano, el número de BAL autóctonas asociadas con él es relativamente pequeño. En comparación, el tracto gastrointestinal de otros muchos animales es un hábitat bien establecido para un gran

número de BAL. Se ha sugerido que el origen de la relación que han establecido las BAL con nuestro organismo fue la elevada ingesta de BAL asociadas a productos vegetales por parte de nuestros antecesores hace más de un millón de años (de Vos, 2011). En contraposición, la conexión de las BAL con los alimentos fermentados es, sin duda, mucho más reciente. Es muy probable que existan complejas interacciones entre los distintos nichos ecológicos (Figura 3) (Douillard y de Vos, 2014).

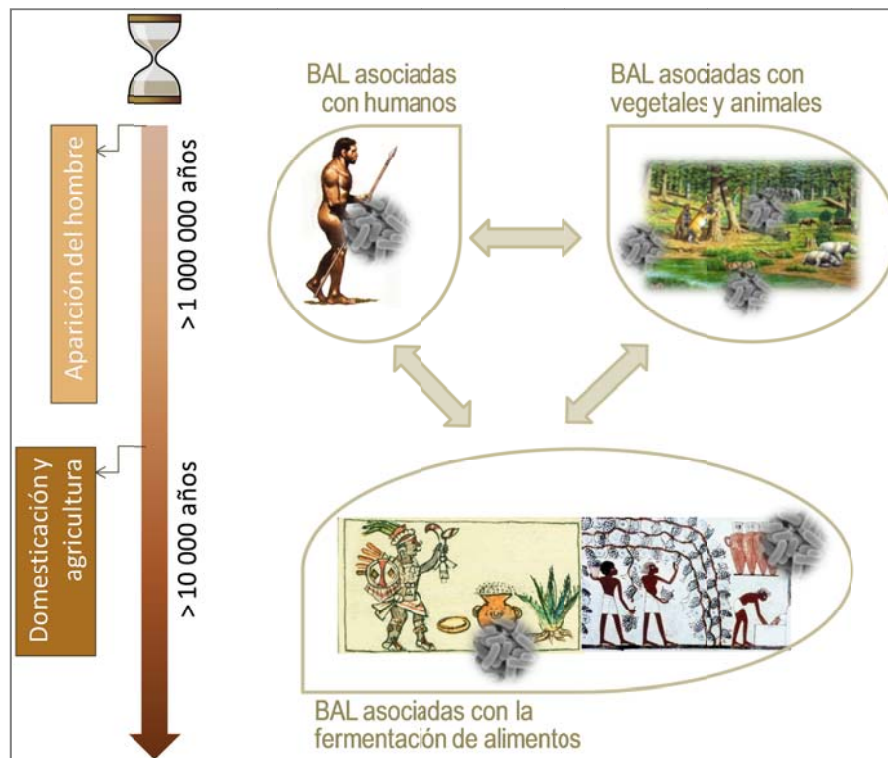


Figura 3. Relaciones entre la asociación de las bacterias lácticas con los animales, las plantas, los humanos y los alimentos fermentados. Fuente: Douillard y de Vos (2014).

El grupo de las BAL es conocido por sus complejos requerimientos nutritivos, probablemente como consecuencia de su adaptación a ambientes ricos en nutrientes. El número de secuencias genómicas disponibles de BAL ha permitido analizar la influencia que tiene la interacción del genoma y el hábitat en el que se encuentran las bacterias en la diversidad observada en este grupo bacteriano (Figura 4). Estos análisis han confirmado su escasa capacidad biosintética y la dependencia de un aporte exógeno y variable, en función de la especie, de carbohidratos fermentables, proteínas, vitaminas, sales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos y/o nucleótidos, que precisamente pueden encontrar en nichos ecológicos ricos en nutrientes, como es el caso de la leche o el tracto gastrointestinal (Douillard y de Vos, 2014; Khalid, 2011; Pfeiler y Klaenhammer, 2007). Las bifidobacterias, por ejemplo, suelen colonizar el tracto gastrointestinal de un gran número de especies animales y están dotadas de una

notable variedad de enzimas extracelulares. Esta dotación enzimática les permite degradar muchos polisacáridos presentes en los alimentos, que no pueden ser digeridos por sus hospedadores, e incluso glicanos de los mismos hospedadores en los que se encuentran, siendo ésta la base de la relación comensal de las bifidobacterias con sus hospedadores (Bottacini *et al.*, 2014). Los mono- y oligosacáridos derivados de la hidrólisis extracelular son, a continuación, transportados al citoplasma por diversos sistemas de transporte para completar su metabolización. Generalmente, todos los genes necesarios para utilizar un determinado oligo- o polisacárido están agrupados en el genoma bacteriano, de tal forma que tanto las hidrolasas específicas como los sistemas de transporte asociados se encuentran bajo una regulación transcripcional común (Bottacini *et al.*, 2014).

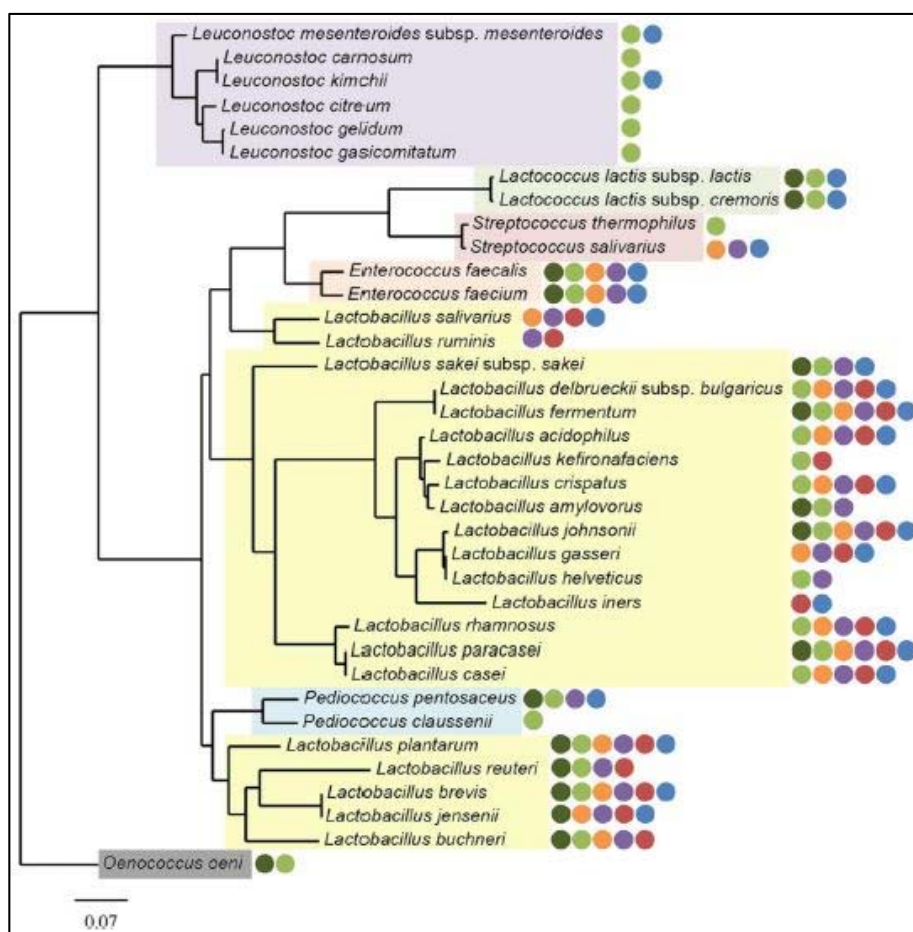


Figura 4. Árbol filogenético de 36 especies de bacterias lácticas basado en la secuencia de 7 genes de referencia (*recA*, *rpoD*, *dnaK*, *infC*, *rplA*, *rpsB* and *rpmA*) mostrando la versatilidad ecológica de cada género. Cada color indica la presencia de aislados en un nicho ecológico particular: material vegetal (verde oscuro), alimentos (verde claro), cavidad oral (naranja), tracto gastrointestinal (morado), cavidad oral (magenta) y otras localizaciones corporales y aislados clínicos (azul). Fuente: Dillard y de Vos (2014).

La disponibilidad de nutrientes en abundancia en el medio (ya sea un alimento o un organismo animal) en el que se encuentran las BAL ha provocado la pérdida de un gran número de genes biosintéticos y la adquisición de un amplio repertorio de otros que codifican sistemas de transporte que les permiten utilizar muy eficientemente los nutrientes presentes en el nicho que habitan (Makarova *et al.*, 2006). Esta especialización se refleja en la presencia de pseudogenes y la reducción de tamaño y la degeneración del genoma bacteriano que se observa en algunas especies de BAL. En contraposición, otras especies dentro del mismo grupo se pueden considerar generalistas, es decir, pueden crecer en distintas condiciones ambientales. Para ello, evidentemente, necesitan sobrevivir a cambios ambientales drásticos y han de tener una flexibilidad metabólica que adquieren mediante la transferencia horizontal de genes (Douillard *et al.*, 2013). En todos los géneros de las BAL se han encontrado plásmidos y/o transposones conjugativos (ambos son moléculas de DNA cuyo tamaño es muy inferior al del cromosoma bacteriano) que están implicados en la pérdida y adquisición de genes.

Al menos otros dos aspectos de las BAL están modelados en gran medida por el hábitat en el que se encuentran. Por un lado, aquellas especies asociadas a un hospedador animal deben disponer de proteínas adecuadas para la interacción con el mismo (adhesión o señalización) mientras que para las asociadas a alimentos fermentados será más ventajoso disponer de otras proteínas que permitan la interacción con los componentes del alimento. Por otra parte, cada nicho ecológico tiene asociado una microbiota natural, que competirá activamente por los nutrientes disponibles, y otros peligros de los que defenderse como, por ejemplo, los bacteriófagos. La producción controlada de ácidos orgánicos y otros compuestos con actividad antimicrobiana, como bacteriocinas, y los sistemas CRISPR-*cas* (del inglés, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR Associated Genes*) proporcionarán armas para combatir a otras bacterias y bacteriófagos o DNA extraño y, por ello, una ventaja competitiva. Finalmente, deben tenerse en cuenta los factores físicos y químicos característicos de cada nicho (por ejemplo, la temperatura o la concentración de sales o ácidos biliares), que pueden llegar a ser bastante extremos y frente a los que las BAL deben ser resistentes para sobrevivir tanto en los alimentos como en el tracto gastrointestinal de los animales y el hombre (Douillard *et al.*, 2013).

Sin duda, la importancia de las BAL deriva de su uso histórico en la elaboración de alimentos fermentados que el hombre inició para conservar y mejorar la calidad de distintas materias primas alimentarias (leche, frutas, carne, cereales) y que sigue haciendo en la actualidad a escala industrial y a nivel mundial. Esto es posible gracias a la notable aptitud que tienen las BAL para utilizar eficientemente los constituyentes de las materias primas alimentarias. Su capacidad para producir ácido láctico como principal producto metabólico final de la fermentación de los carbohidratos tiene una gran importancia económica y sanitaria, puesto que esta acidificación inhibe el crecimiento de microorganismos alterantes y contribuye a la seguridad de los

productos fermentados. Por otro lado, algunos de los compuestos derivados del metabolismo de las BAL (ácidos láctico y acético, citrato o etanol) están involucrados en la formación de numerosos compuestos aromáticos y sápidos (Leroy, 2004). Otras cepas de BAL tienen la capacidad de formar exopolisacáridos aportando viscosidad y textura al producto fermentado (Ruas-Madiedo, 2002). En conjunto todos estos compuestos son responsables de las características organolépticas típicas de los productos fermentados y son de gran importancia tanto en los productos de elaboración artesanal como industrial.

Dentro de los productos fermentados el sector de mayor importancia es el lácteo, en el que se ha descrito la existencia de más de 3500 productos lácteos fermentados a nivel mundial, aunque de entre todos ellos destacan claramente el queso y el yogur. La fermentación de la leche que realizan las BAL, principalmente especies de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*, permite alargar su vida útil, contribuye a la seguridad microbiológica de los productos obtenidos y, además, mejora la digestibilidad de algunos importantes nutrientes de la leche (como la lactosa y las proteínas). De hecho, el impacto de los productos lácteos fermentados en el mercado global es considerable. Por ejemplo, el valor económico a nivel mundial del queso en 2012 fue de aproximadamente 62700 millones de euros y se espera que supere los 100.000 millones en 2019 (<http://www.marketwatch.com/story/cheese-american-italian-hard-soft-fresh-and-others-market-global-industry-analysis-size-share-growth-trends-and-forecast-2013-2019-2014-05-06>). Además, con el aumento de la productividad, el desarrollo tecnológico y los cambios sociales observados en las últimas décadas, se están abriendo nuevos mercados para los productos lácteos, en general, y para los productos fermentados, en particular. Estos productos comienzan a tener un papel importante en la dieta de la población de algunas partes del mundo en las que apenas se consumían hace unos cuarenta años (Asia, Latinoamérica, Caribe) (FAO, 2013)

Una importante cualidad de las BAL, que ha ganado un gran protagonismo en los últimos años, es su potencial probiótico debido al amplio rango de efectos beneficiosos que pueden ejercer sobre la salud y el bienestar de los animales, incluyendo el hombre. Los probióticos se definen como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del hospedador” (FAO/WHO, 2002). En este sentido, la mayor parte de las cepas probióticas estudiadas y con interés comercial pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Saxelin *et al.*, 2005). Diversos estudios demuestran la incidencia positiva de estos microorganismos en la prevención de infecciones gastrointestinales, intolerancia a la lactosa, alergias, así como en la modulación del sistema inmunitario (Dicks y Botes, 2010). Por ello, ha habido un gran interés en el desarrollo de cultivos probióticos comerciales para poder incluirlos en productos fermentados o emplearlos como suplementos nutritivos. El mercado global de productos probióticos, incluyendo ingredientes, suplementos y alimentos, se ha estimado en unos 23.400 millones de

euros en 2013 y se espera que crezca a un ritmo anual de un 6,2% durante los próximos cinco años para alcanzar los 31.7000 millones en 2018. Sólo en la última década se han introducido más de 500 productos probióticos en la industria alimentaria. Se trata de un mercado muy dinámico y que se está afianzando como consecuencia de la creciente evidencia científica sobre los beneficios de los probióticos para la salud. Dentro del mercado de los probióticos, los productos lácteos son el sector con mayor demanda (<http://www.nutraingredients.com/Markets-and-Trends/Global-probiotics-market-to-grow-6.8-annually-until-2018>).

Los productos fermentados y los microorganismos implicados en estos procesos se han consumido desde tiempos remotos con un amplio historial de consumo seguro. Sin embargo, existe un género de BAL que tiene una posición ambigua en lo que respecta a la seguridad de su uso en la alimentación. Algunas cepas del género *Enterococcus* se han relacionado con infecciones nosocomiales y pueden tener propiedades indeseables para su aplicación en la elaboración de alimentos fermentados por la presencia de factores de virulencia y la resistencia a antibióticos empleados comúnmente en medicina o la posesión de mecanismos que permiten el intercambio genético de estas características (Eaton *et al.*, 2001; Franz *et al.*, 2001) Otra propiedad problemática que afecta no solo a los enterococos, sino también a otros géneros de BAL como *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus*, es la producción de aminas (Ladero *et al.*, 2010; Linares *et al.*, 2011).

El grupo de las BAL también incluye miembros que pueden causar defectos organolépticos en productos fermentados (como yogur, queso, vino...). Los principales defectos se relacionan con el sabor (ácido, amargo, a malta) y la producción excesiva de ácido láctico, péptidos y aldehídos, entre otros. El olor también puede verse afectado por la aparición de aldehídos (malta), ésteres (afrutado) o productos de la proteólisis (putrefacción y olor a fenol). Los cambios en la textura se deben a la formación de CO₂ y/o polisacáridos e, incluso, el color puede variar por la presencia de lactobacilos pigmentados (Cabeza-Herrera, 2006).

II.1.1. El género *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* fue descrito por primera vez por Beijerinck en 1901 y es el más diverso, extenso e importante dentro del grupo de las BAL. Comprende 212 especies según la base de datos *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* (LPSN; <http://www.bacterio.net>, Euzéby, 1997), incluyendo varias especies nuevas (Salveti *et al.*, 2012). El género *Lactobacillus* pertenece al filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales* y familia *Lactobacillaceae* (Figura 2).

El contenido de G+C del DNA de las especies de este género oscila entre 32 y 55%, un rango dos veces más grande de lo que generalmente se acepta para un género (Axelsson, 2004). Las características morfológicas y fisiológicas diferenciales del

género *Lactobacillus* se muestran en la Tabla 1. Tienen morfología bacilar, aunque algunas especies tienen forma de cocobacilos, pueden crecer formando filamentos y generalmente son anaerobios o aerotolerantes y acidúricos o acidófilos. El rango de temperatura en el que pueden multiplicarse oscila entre 2 y 53°C, aunque el óptimo generalmente se considera entre 30 y 40°C. En cuanto al pH, pueden crecer en el rango 3-8, pero el óptimo se sitúa entre 5,5 y 6,2 (Salveti *et al.*, 2012).

II.1.1.1. Filogenia del género *Lactobacillus*

La relación filogenética del género *Lactobacillus* con otros géneros de BAL todavía es objeto de controversia porque hay cierta discrepancia en los resultados obtenidos en función de la información empleada en el análisis (gen 16S rDNA, genes nucleares o de proteínas ribosómicas o de otras proteínas conservadas). En concreto, uno de los temas más polémicos es la relación filogenética entre los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Oenococcus* y *Leuconostoc*, los cuales se han considerado tradicionalmente que estaban muy relacionados por el solapamiento de sus características morfológicas y bioquímicas (Hammes y Hertel, 2003; Stiles y Holzapfel, 1997).

Un estudio reciente sobre las relaciones filogenéticas en los principales géneros de BAL utilizando la secuencia de 232 genes ortólogos obtenidos a partir del genoma de 28 especies, dividió a las BAL en dos grupos: uno incluía a las familias *Lactobacillaceae* y *Leuconostocaceae*, mientras que el otro englobaba a las familias *Enterococcaceae* y *Streptococcaceae* (Figura 5) (Zhang *et al.*, 2011). En ese mismo estudio algunas especies del género *Lactobacillus* mostraban una relación más estrecha con especies de la familia *Leuconostocaceae* que con otras especies de la familia *Lactobacillaceae*, por lo que se sugirió que ambas familias deberían combinarse en una sola (Zhang *et al.*, 2011). Siguiendo con el mismo estudio, el grupo que englobaba a las familias *Lactobacillaceae* y *Leuconostocaceae* se dividió a su vez en dos subgrupos: el primero estaba compuesto por las especies de *Lactobacillus* pertenecientes al grupo “acidophilus” (*Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) junto con otras dos especies de *Lactobacillus* (*Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus casei*) mientras que el segundo (subgrupo “salivarius”) incluye cinco especies de *Lactobacillus* (*Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus fermentum*) y los géneros *Pediococcus*, *Oenococcus* y *Leuconostoc* (Figura 5) (Zhang *et al.*, 2011).

Tabla 1. Características diferenciales de los principales géneros de bacterias lácticas.

Familia	Género	Morfología	Producción de CO ₂ a partir de glucosa	Crecimiento					Isómero del ácido láctico	
				10°C	45°C	NaCl (6,5 %)	NaCl (18 %)	pH 4,4		pH 9,6
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i>	Cocos (tétradas)	-	+	-	+	-	-	+	L
<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i>	Bacilos	-	+	-	ND	-	ND	-	L
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	Cocos	-	+	+	+	-	+	+	L
	<i>Tetragenococcus</i>	Cocos (tétradas)		+	-	+	+	+/-	+	
	<i>Vangococcus</i>	Cocos		+	-	-	-		-	
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	Bacilos	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	-	D, L, DL
	<i>Pediococcus</i>	Cocos (tétradas)	-	+/-	+/-	+/-	-	+	-	L, DL
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i>	Cocos	+	+	-	+/-	-	+/-	-	D
	<i>Oenococcus</i>	Cocos/bacilos	+	+	-	+/-	-	+/-	-	D
	<i>Weissella</i>	Cocos/bacilos	+	+	-	+/-	-	+/-	-	D, DL
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i>	Cocos	-	+	-	-	-	+/-	-	L
	<i>Streptococcus</i>	Cocos	-	-	+/-	-	-	-	-	L

+/-: variable

Fuente: Axelsson, 2011.

II.1.1.2. Principales métodos de identificación de *Lactobacillus*

Antiguamente la identificación de las especies del género *Lactobacillus* se hacía en base al crecimiento en medios específicos, la tinción de Gram, la morfología celular, la capacidad de utilizar distintos carbohidratos como fuentes de carbono, el análisis de los productos de fermentación y el ensayo de algunas actividades enzimáticas. Estos métodos fenotípicos tienen escasa validez por la falta de reproducibilidad y la diversidad de cepas o biotipos que componen una especie (Tannock, 1999). Además, es muy común que se produzcan errores cuando las especies están relacionadas. A pesar de ello, algunos métodos basados en propiedades fisiológicas (fermentación de compuestos carbonados, detección de actividades enzimáticas), desarrollados inicialmente para la identificación, como los sistemas API 50 CHL o API ZYM (BioMérieux, Francia) y BIOLOG AN Microplate® (Biolog Inc., Hayward, California, EE. UU.) podrían ser de interés para obtener una visión global rápida de las capacidades metabólicas de los aislados (Herbel *et al.*, 2013).

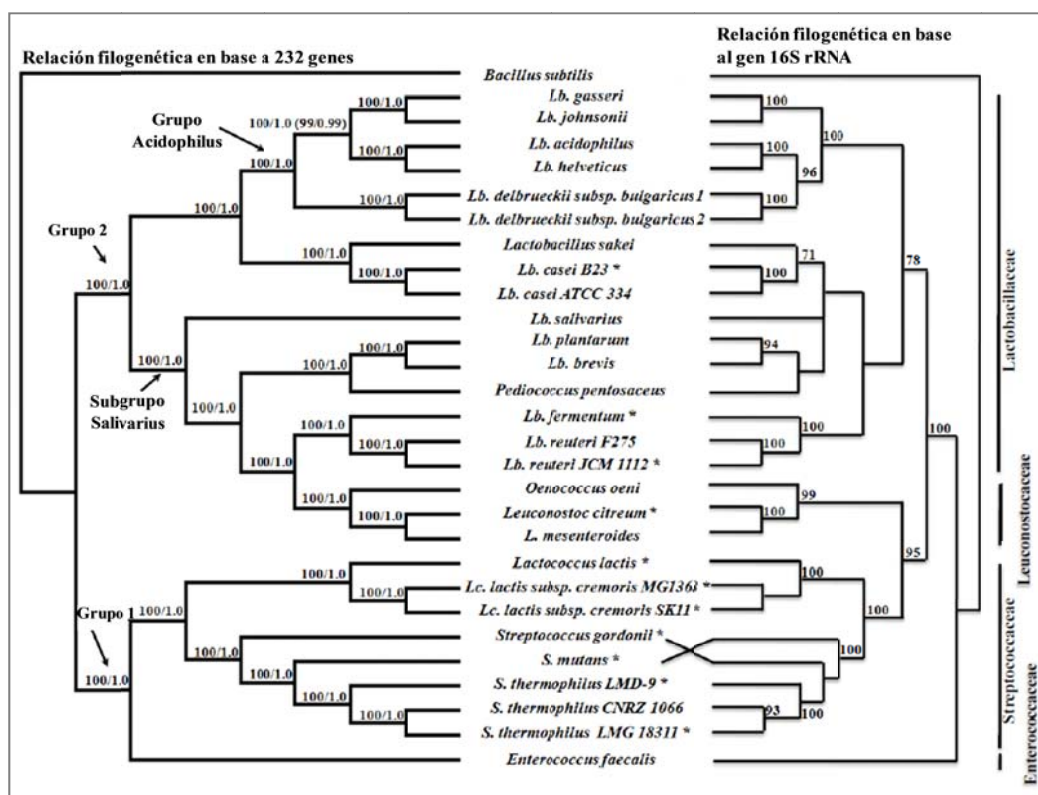


Figura 5. Relación filogenética de las especies del género *Lactobacillus* con otras especies de BAL de interés utilizando una selección de 232 genes ortólogos y el gen 16S rDNA de un total de 29 especies de BAL. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 1 y 2 son *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC BAA-365 y ATCC 11842, respectivamente. Fuente: Zhang *et al.* (2011).

Los problemas que plantean los métodos tradicionales hacen que sea preferible abordar la identificación de microorganismos utilizando métodos moleculares, que no dependen de las condiciones de cultivo y son mucho más reproducibles. Estos métodos generalmente están basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) que, además, permite cuantificar no sólo los microorganismos cultivables sino también los no cultivables (Tabla 2). Una forma muy rápida para la identificación de especies de *Lactobacillus* es la PCR de colonia; consiste en hacer una PCR convencional en un lisado celular crudo (obtenido a partir de una colonia) utilizando cebadores específicos de especie. Permite identificar un microorganismo con bastante rapidez (en tan solo unas tres horas) cuando se dispone de una colonia bacteriana aislada (Herbel *et al.*, 2013; Tannock, 1999).

Tabla 2. Comparación de distintos métodos para la identificación de microorganismos.

Método	Detección a nivel de	Cuantificación	Dependiente de cultivo	Duración aproximada*
Morfología de la bacteria	No	-	+	48 h (cultivo)
API 50 CHL	Género Especie	-	+	48 h
PCR del gen 16S/23S rDNA + secuenciación	Género Especie	-	+	31 h: Aislamiento de DNA: 4 h PCR: 3 h Secuenciación: 24 h
PCR-DGGE	Género Especie	+ (muy limitada)	-	23 h: Aislamiento de DNA: 4 h PCR: 3 h Electroforesis: 16 h
RAPD	Género Especie Subespecie Cepa	-	+	8,5 h: Aislamiento de DNA: 4 h PCR: 3 h Electroforesis: 1,5 h
qPCR	Género Especie	++	-	7 h: Aislamiento de DNA: 4 h qPCR: 3 h
PFLG	Género Especie Subespecie Cepa	-	+	72 h: Digestión: 48 h Incubación enzima de restricción: 12 h Electroforesis: 16-24h
Secuenciación completa del genoma	Género Especie Subespecie	-	+	> 40 h Aislamiento de DNA: 4 h Secuenciación: 36 h Anotación...
MALDI-TOF MS	Género Especie Subespecie	-	+	1 h

Probablemente la técnica más utilizada durante los últimos años sea la secuenciación parcial o completa del gen 16S rDNA o de la región intergénica 16S-23S del rDNA. El gen 16S rDNA es el marcador más empleado para la identificación de bacterias a nivel de especie por encontrarse en todas las células, detectarse con facilidad y poseer numerosas regiones variables. En este caso, se secuencian los amplicones obtenidos con cebadores específicos y, posteriormente, se compara esa secuencia con las depositadas en bases de datos de acceso público o privado. La base de datos que contiene un mayor número y variedad de secuencias es la base pública GenBank NCBI (del inglés, *National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). El programa BLAST (del inglés, *Basic Local Alignment Tool*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) permite encontrar todas aquellas secuencias depositadas en la base de datos que tengan homología con la secuencia que estamos analizando (Herbel *et al.*, 2013).

Cuando se trata de caracterizar una muestra microbiológica compleja o analizar las variaciones que se producen en ella con el tiempo se puede emplear la electroforesis en geles con un gradiente de desnaturalización o DGGE (del inglés, *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). Esta es una técnica independiente de cultivo y se basa en una primera amplificación por PCR de la secuencia del gen 16S rDNA y, después, en la separación de los amplicones mediante electroforesis en presencia de un agente desnaturalizante. El avance de los fragmentos en el gel depende de su temperatura de fusión, que varía con la composición de nucleótidos. La técnica DGGE tiene un poder de discriminación tan elevado que permite distinguir, al menos en teoría, moléculas que difieren tan solo en un nucleótido comparando con los patrones adecuados. Además proporciona información semicuantitativa de las especies presentes. Se ha demostrado su utilidad para identificar las comunidades bacterianas presentes en productos fermentados, como por ejemplo el queso (Florez y Mayo, 2006).

Otras técnicas moleculares que permiten distinguir entre aislados de una misma especie son la amplificación al azar de DNA polimórfico o RAPD (del inglés, *Random Amplification of Polymorphic DNA*), la amplificación de fragmentos genómicos digeridos por enzimas de restricción o AFLP (del inglés, *Amplified Fragment Length Polymorphism*) y la electroforesis en gel en campo pulsado o PFGE (del inglés, *Pulse Field Gel Electrophoresis*). Las dos primeras se basan inicialmente en una reacción de PCR.

La técnica RAPD emplea pequeños cebadores inespecíficos con secuencias arbitrarias que hibridan al azar en múltiples sitios de la secuencia genómica de la bacteria analizada y genera un patrón de bandas (similar a una huella dactilar) característico de esa especie. Tiene la ventaja de ser una técnica muy rápida y barata que no requiere cebadores específicos. Pero es difícil obtener resultados reproducibles en el tiempo y entre laboratorios porque es muy sensible a variaciones dependiendo de

la preparación de la muestra y las condiciones de la reacción. La técnica AFLP es más compleja pero permite detectar mejor las diferencias entre genotipos. Combina la amplificación por PCR de una secuencia con su digestión con enzimas de restricción y también genera un patrón específico de bandas. Por último, la técnica PFGE es más sensible, pero también mucho más compleja y laboriosa porque requiere la digestión del genoma bacteriano incluido en una matriz de agarosa con una enzima de restricción; los fragmentos derivados de la digestión se separan mediante un campo eléctrico que cambia de dirección de una forma programada para mejorar la separación. Probablemente, esta última sea una de las técnicas que tiene un mayor poder discriminante a nivel de cepa.

Existen otras muchas técnicas independientes de cultivo que se basan en el empleo de DNA aislado directamente de la muestra. Entre ellas, la PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR) que tiene la peculiaridad de registrar cómo se va produciendo la amplificación del DNA y no requiere el procesamiento electroforético posterior de los productos de PCR. Además, no sólo permite la identificación sino que también proporciona una estimación de la concentración de un microorganismo, en una sola etapa (7 h) (Herbel *et al.*, 2013). Las micromatrices de DNA (*microarrays*) permiten el estudio simultáneo de miles de genes o del mismo gen en miles de microorganismos y, por lo tanto, la caracterización microbiológica detallada de muestras complejas.

Finalmente, la secuenciación completa del cromosoma bacteriano es la técnica que nos permite obtener la mayor cantidad posible de información sobre un determinado microorganismo. En los últimos años se está constatando un vertiginoso desarrollo de las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, con una reducción extraordinaria tanto de su precio como del tiempo necesario para disponer de los resultados. La primera secuencia genómica publicada de una bacteria del grupo de las BAL fue la de *Lc. lactis* subsp. *lactis* IL1403 en el año 2001, seguida por la de *Lb. plantarum* WCFS1 en el año 2003 (Bolotin *et al.*, 2001; Kleerebezem *et al.*, 2003). En este momento y en las bases de datos públicas ya hay secuencias genómicas bastante completas disponibles de más de 81 especies del género *Lactobacillus*; es muy probable que el número de secuencias en poder de la industria sea aún mayor (Tabla 3). Además, de aproximadamente la mitad de las especies indicadas, se dispone de la secuencia de varias cepas, que en el caso de *Lactobacillus paracasei* se eleva a 38 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>). Además de la identificación inequívoca de un aislado, la secuenciación del genoma tiene numerosas aplicaciones, como, por ejemplo, descubrir la producción de metabolitos secundarios de interés y mejorar la fermentación así como comprender distintos aspectos funcionales, fisiológicos y evolutivos de los microorganismos. Permitirá, incluso, desentrañar el metabolismo y la función de especies bacterianas que no son cultivables con la tecnología disponible actualmente (Herbel *et al.*, 2013)

Tabla 3. Características del genoma de algunas especies del género *Lactobacillus*.

Microorganismo	Origen	Tamaño del genoma (Mpb)	Número de plásmidos	% GC	Número de Proteínas	Referencia
<i>L. acidophilus</i> NCFM	Heces	1,99	0	34,7	1,832	Altermann <i>et al.</i> , 2005
<i>L. amylovorus</i> GRL 1112	Heces de cerdo	2,13	2	38,1	2,121	Kant <i>et al.</i> , 2011
<i>L. brevis</i> ATCC 367	Desconocido	2,34	2	46,0	2,218	Makarova <i>et al.</i> , 2006
<i>L. bucheri</i> ATCC 11577	Cavidad oral	2,86	n.d.	39,5	3,002	(1)
<i>L. casei</i> BL 23	Queso	3,08	0	46,3	2,997	Mazé <i>et al.</i> , 2010
<i>L. crispatus</i> EM-LC1	Heces	1,83	n.d.	37,0	1,751	(1)
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842	Lácteos	1,87	0	49,7	1,529	Makarova <i>et al.</i> , 2006
<i>L. fermentum</i> CECT 5716	Leche humana	2,10	0	51,5	1,686	Jiménez <i>et al.</i> , 2010
<i>L. fermentum</i> IFO 3956	Vegetales	2,10	0	51,5	1,843	Morita <i>et al.</i> , 2008
<i>L. gasserii</i> ATCC 33323	Humano	1,89	0	35,3	1,755	Makarova <i>et al.</i> , 2006
<i>L. helveticus</i> DPC 4571	Queso	2,08	0	37,1	1,610	Callanan <i>et al.</i> , 2008
<i>L. iners</i> AB-1	Cavidad vaginal	1,29	0	32,7	1,209	Macklaim <i>et al.</i> , 2011
<i>L. jensenii</i> 269-3	Cavidad vaginal	1,69	n.d.	34,4	1,575	(1)
<i>L. johnsonii</i> NCC 533	Intestino	1,99	0	34,6	1,821	Pridmore <i>et al.</i> , 2004
<i>L. kefirano</i> subsp. <i>kefirano</i> ZW3	Kefir	2,35	2	37,4	2,162	Wang <i>et al.</i> , 2011
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>casei</i> N1115	Lácteos	3,06	4	46,5	2,985	Wang <i>et al.</i> , 2014
<i>L. plantarum</i> WCFS1	Saliva	3,35	3	44,4	3,063	Siezen <i>et al.</i> , 2012
<i>L. reuteri</i> DSM 20016	Intestino	2,0	0	38,9	1,900	(1)
<i>L. rhamnosus</i> GG	Intestino	3,01	0	46,7	2,913	Kankainen <i>et al.</i> , 2009
<i>L. ruminis</i> ATCC 25644	Intestino	2,07	0	43,7	2,153	Forde <i>et al.</i> , 2011
<i>L. salivarius</i> CECT 5713	Leche humana	2,14	2	33,0	1,936	Jiménez <i>et al.</i> , 2010
<i>L. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> UCC 118	Intestino	2,13	3	33,0	2,013	Claesson <i>et al.</i> , 2006
<i>L. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23k	Carnes	1,88	0	41,3	1,871	Chaillou <i>et al.</i> , 2005

(1) Según información disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>

Una alternativa que está cogiendo una gran fuerza en los últimos años es la identificación físico-química mediante la técnica MALDI-TOF MS, es decir, por espectrometría de masas (MS, del inglés *Mass Spectrometry*) combinada con la desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI, del inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*) con posterior detección de iones con analizador de tiempo de vuelo (TOF, del inglés *Time-Of-Flight*) que permite obtener la “huella espectral” de un microorganismo. Esta técnica hace posible identificar un aislado a partir de una única colonia obtenida en cualquier medio de cultivo habitual. Para ello una pequeña porción de masa bacteriana se cubre con una matriz de compuestos aromáticos; después se seca y la mezcla se somete a la acción de un láser que la hidroliza, determinándose la masa absoluta de los fragmentos ionizados de pequeño tamaño en un espectrómetro de masas. La huella espectral es única para cada especie y permite la identificación con una rapidez extraordinaria. Por ello se está implantando con gran rapidez en los laboratorios de diagnóstico como método rutinario. El factor limitante en esta técnica es la disponibilidad de espectros en las bases de datos comerciales con las que se compara el espectro obtenido para el microorganismo a identificar y los costes asociados a la compra, uso y mantenimiento del equipo (Herbel *et al.*, 2013). La técnica MALDI-TOF MS se vislumbra como el método de elección para la identificación de especies del género *Lactobacillus* cuando las bases de datos de huellas espectrales disponibles se amplíe (Dušková *et al.*, 2012).

II.1.1.3. Nichos ecológicos del género *Lactobacillus*

Los lactobacilos son prácticamente ubicuos y, de los distintos géneros del grupo de las BAL, las especies del género *Lactobacillus* son las que se encuentran habitualmente en un mayor número de nichos ecológicos distintos (Figura 4). Requieren que exista en el medio una fuente de carbono abundante, aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento. Por ello, son comunes en muchos hábitats relacionados con alimentos, como leche, carne, frutas, hortalizas y granos de cereales, y durante milenios se han empleado para su conservación mediante la fermentación (Tabla 4).

Históricamente, el género *Lactobacillus* ha tenido una gran aplicación en la industria láctea, en concreto en la elaboración de yogur (gracias a la clásica relación simbiótica entre *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, anteriormente denominada *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) y otras leches fermentadas (*L. acidophilus*, *L. kefir*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) así como en la de ciertas variedades de queso (*L. helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que toleran alta temperatura o especies mesófilas como *L. casei*, *L. plantarum*, *L. brevis* y *L. buchneri* que pueden crecer durante la maduración) (Galesloot *et al.*, 1968; Maragkoudakis *et al.*, 2006; Shankar y Davies, 1978; Toba *et al.*, 1986). En la actualidad, los lactobacilos son utilizados con profusión

como cultivos iniciadores y adjuntos para dirigir o contribuir a la fermentación de numerosas materias primas alimentarias (Tabla 4).

Igualmente, los lactobacilos son muy empleados durante el ensilado para dominar la fermentación que permite conservar los nutrientes del forraje para el ganado, evitando cambios químicos y el crecimiento de microorganismos aeróbicos indeseables (Giraffa *et al.*, 2010). Además, algunas especies del género *Lactobacillus* están asociadas de forma natural con las mucosas y son parte de la microbiota comensal de los tractos respiratorio, digestivo y genitourinario del hombre y de otros animales, así como de otras mucosas secretoras como la glándula mamaria durante la lactancia (Fernández *et al.*, 2014; Walter, 2008).

Durante mucho tiempo ha imperado la creencia de que los lactobacilos formaban parte de los microorganismos dominantes en el tracto gastrointestinal humano. Esta creencia se remonta a épocas en las que la diversidad microbiana se estudiaba utilizando técnicas clásicas de cultivo. De hecho, esta idea se mantiene todavía en algunos libros de texto incluso cuando la gran mayoría de estudios realizados a partir de 1960 ha demostrado que los lactobacilos constituyen solo un pequeño porcentaje de los microorganismos del intestino humano (Figura 6) (*The Human Microbiome Project Consortium*, 2012). Cuando se aíslan lactobacilos en muestras fecales, éstos se encuentran en una concentración de aproximadamente 10^6 unidades formadoras de colonia (ufc) por gramo, lo cual supone tan solo el 0,01% del total de microorganismos cultivables en este tipo de muestras. Entre las especies aisladas habitualmente de muestras fecales humanas se encuentran *L. gasseri*, *L. salivarius*, *L. ruminis* y *L. reuteri*, aunque también se han aislado con menor frecuencia *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. sakei* y *L. vaginalis* (Hammes y Hertel, 2006; Walter, 2008). En personas sanas, la concentración de lactobacilos en el colon ($10^4 - 10^8$ ufc/g) es superior a lo observado en el estómago y el íleon ($10^3 - 10^7$ ufc/g), donde el total de microorganismos cultivables es también mucho menor (Felis y Dallaglio, 2007; Lee y Salminen, 2009; Salvetti, 2012; Walter, 2008).

En la cavidad oral los lactobacilos representan tan solo el 1% de la microbiota cultivable (Dewhirst *et al.*, 2010). Las especies asociadas a la microbiota oral en individuos sanos son tanto especies heterofermentativas, como *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. casei* o *L. fermentum*, como homofermentativas, como *L. gasseri* y *L. salivarius* (Köll-Klais *et al.*, 2005). En el tracto respiratorio, cuyo microbioma se asemeja mucho al microbioma oral y se caracteriza por estar dominado por bacterias anaerobias como *Prevotella*, *Veillonella* y *Streptococcus*, los lactobacilos apenas están representados (Charlson *et al.*, 2011).

Tabla 4. Empleo de *Lactobacillus* en la elaboración de fermentados

Función	Producto	Especie	Referencia
Conservación			
Producción de ácidos orgánicos	Productos cárnicos	<i>L. curvatus</i>	Vogel <i>et al.</i> (1993)
Producción de bacteriocinas		<i>L. sakei</i>	Hugas <i>et al.</i> (1995)
	Quesos semiduros	<i>L. gasseri</i>	Bogovíe <i>et al.</i> (2007)
	Quesos blandos	<i>L. plantarum</i>	Ennar <i>et al.</i> (1998)
	Aceitunas	<i>L. plantarum</i>	Ruiz-Barba <i>et al.</i> (1994)
	Tofu	<i>L. sakei</i>	Schillinger <i>et al.</i> (2001)
Mejora de las propiedades organolépticas			
Aroma	Quesos	<i>L. plantarum</i>	Poveda <i>et al.</i> (2003)
Producción de exopolisacáridos			Skeie <i>et al.</i> (2008)
Prevención del exceso de acidez	Yogur	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Lynch <i>et al.</i> (2014)
Síntesis de compuestos bioactivos			
Producción de polialcoholes		<i>L. plantarum</i>	Wisselink <i>et al.</i> (2002)
Producción de vitaminas del grupo B		<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Hugenholtz y Kleerebezem (1999)
Producción de péptidos con actividad hipotensora	Quesos	<i>L. helveticus</i>	
Degradación de antinutrientes	Leches fermentadas	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Gobbetti <i>et al.</i> (2000)
		<i>L. plantarum</i>	Sharma y Kapoor (1996)

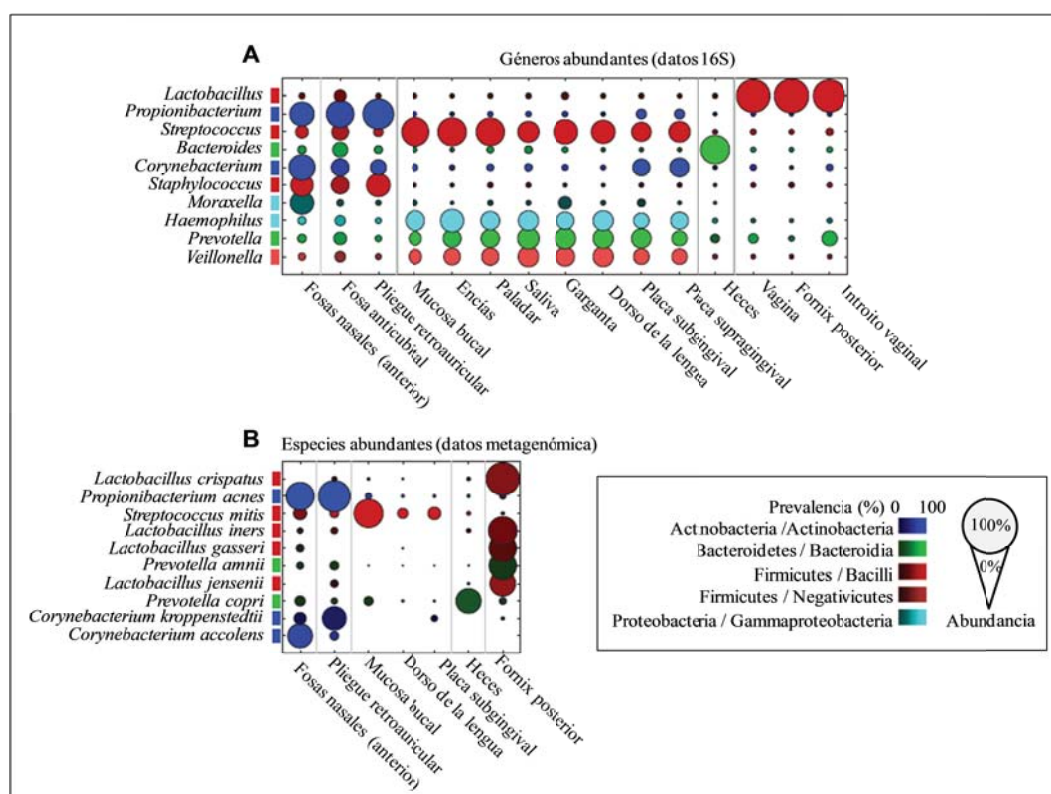


Figura 6. Abundancia de los principales taxones (A, a nivel de género; B, a nivel de especie) en el microbioma humano. Fuente: Huttenhower *et al.* (2012).

En contraste, la microbiota vaginal normalmente está dominada por distintas especies del género *Lactobacillus* (*L. iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* o *L. salivarius*) (Figura 6). Se ha descrito que existe una proporción variable (7-33%) de mujeres en las que no se encuentran cantidades apreciables de *Lactobacillus* en esta localización corporal pero si especies de otros géneros bacterianos que también tienen la capacidad de producir ácido láctico (Lamont *et al.*, 2011).

Muchos de los lactobacilos asociados a las mucosas han despertado un gran interés por el potencial efecto beneficioso que pueden tener para nuestra salud, lo que se refleja en la gran cantidad de cepas que se comercializan en este momento como probióticos (Courret *et al.*, 2003; Herbel *et al.*, 2013). Sin embargo, todavía no se conocen con detalle los mecanismos moleculares en los que se sustenta la mayor parte de las propiedades probióticas descritas hasta el momento (Kleerebezem *et al.*, 2010; Turpin *et al.*, 2010).

II.1.2. El género *Enterococcus*

Este género incluye BAL con forma esférica u ovoide y cuyas células se disponen individualmente, en parejas o formando cadenas cortas y que pueden

proliferar en una cierta variedad de ambientes hostiles (Figura 1). Los enterococos pueden crecer en un rango bastante amplio de temperatura (5-50°C) y pH (4,4-10), y en presencia de 6,5% de NaCl y de 4% de bilis en el medio (Vu y Carvalho, 2011; Tabla 1) aunque no todas las especies o cepas pueden multiplicarse en todas estas condiciones. Además, los enterococos tienen la capacidad de sobrevivir a un calentamiento a 60°C durante 30 minutos, lo que los sitúa entre en las bacterias no esporuladas más termorresistentes (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Lebreton *et al.*, 2014; Vu y Carvalho, 2011).

Los enterococos pueden multiplicarse tanto en presencia de oxígeno como en ambientes con un contenido reducido de este elemento. Algunas especies también poseen una cadena de transporte de electrones y en presencia de una fuente exógena de grupos hemo tienen un metabolismo respiratorio; en ausencia de hemo, su metabolismo es fermentativo (Ramsey *et al.*, 2014). Los enterococos suelen ser homofermentativos y producir ácido L(+)-láctico. También es característica su capacidad para hidrolizar esculina, incluso en presencia de 4% de bilis, y generar esculetina que forma un complejo insoluble de color verde oliva-negruzco en presencia de iones hierro en el medio. En general, los enterococos son inmóviles aunque hay, al menos, dos especies móviles (*Enterococcus gallinarum* y *Enterococcus casseliflavus*). La pigmentación es un rasgo variable, existiendo algunas especies con coloración amarilla que suelen estar asociadas a material vegetal, como *Enterococcus sulfureus*, *E. casseliflavus* y *Enterococcus mundtii* (Lebreton *et al.*, 2014; Vu y Carvalho, 2011).

II.1.2.1. Filogenia del género *Enterococcus*

El género *Enterococcus* pertenece al filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales* y familia *Enterococcaceae* (Figura 2). Los enterococos inicialmente se incluyeron dentro del género *Streptococcus*, hasta que en los años 80 se demostró que *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus faecium* estaban muy distantes genéticamente del resto de los estreptococos, reclasificándose en un nuevo género (*Enterococcus*) como *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, respectivamente (Schleifer y Kilpper-Balz, 1984; Devriese *et al.*, 1993). Precisamente, estas dos especies de enterococos, *E. faecalis* y *E. faecium*, son las que se encuentran con mayor frecuencia en distintos ambientes (Figura 4).

El análisis filogenético basado en la secuencia del gen 16S rDNA indica que el género *Enterococcus* está más relacionado con los géneros *Vagococcus*, *Tetragenococcus* y *Carnobacterium* que con *Streptococcus* y *Lactococcus*. Hasta el momento se han descrito 52 especies dentro de este género (<http://www.bacterio.net>; Euzéby, 2013). El análisis de las secuencias disponibles del gen 16S rDNA divide a los enterococos en 7 grupos que guardan una cierta relación con los nichos ecológicos en los que se han encontrado (Figura 7).

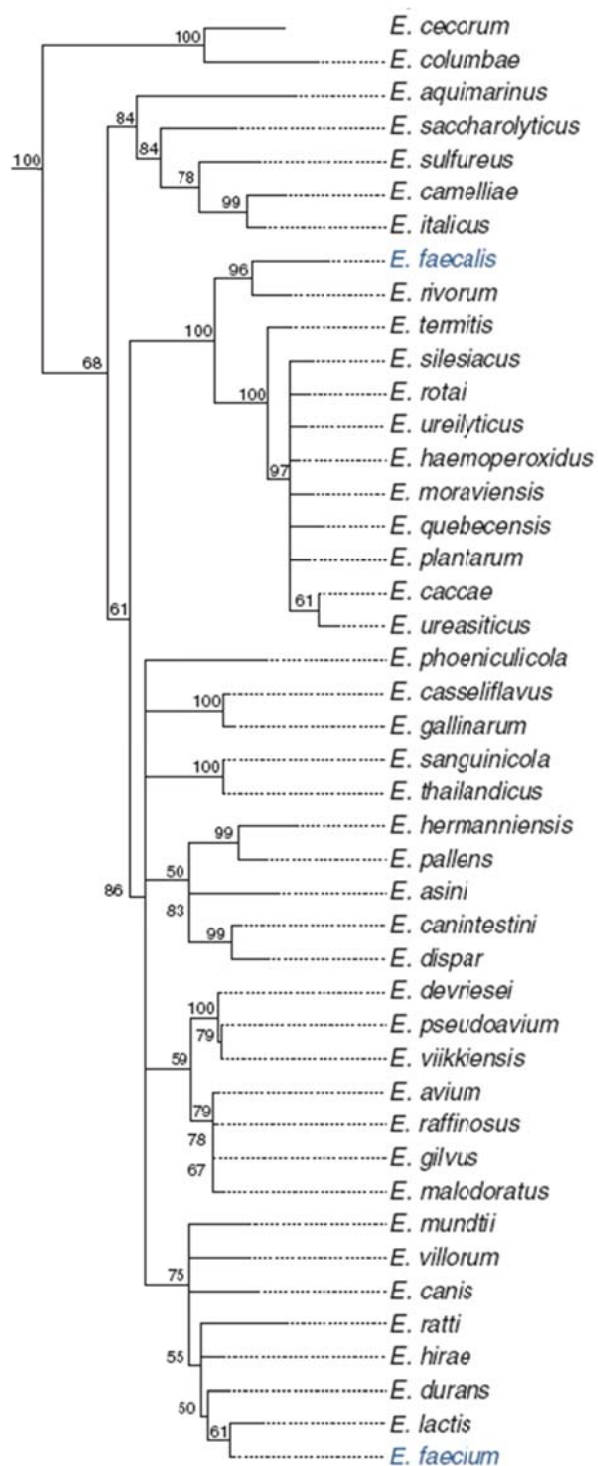


Figura 7. Dendrograma del género *Enterococcus* basado en el análisis de las secuencias disponibles del gen 16S rDNA. Fuente: Gilmore *et al.* (2013).

II.1.2.2. Los enterococos como comensales

Los enterococos parecen haber evolucionado como miembros extraordinariamente adaptados de la microbiota intestinal en una gran variedad de

hospedadores, incluyendo insectos, reptiles, pájaros y mamíferos. Su presencia ubicua en el tracto gastrointestinal de numerosas especies animales los señala como uno de los primeros integrantes de la microbiota intestinal, aunque no lleguen a representar ni el 1% de los microorganismos cultivables en muestras fecales (Gilmore *et al.*, 2013; Lebreton *et al.*, 2014).

Su distribución no se limita al tracto gastrointestinal, ya que se pueden encontrar también en otras localizaciones como, por ejemplo, el tracto genitourinario o la cavidad orofaríngea, ni al mundo animal, puesto que están ampliamente distribuidos en la naturaleza, asociados también a los vegetales, a numerosos alimentos elaborados por el hombre y al ambiente (suelo y agua). Antiguamente, la presencia de enterococos en los alimentos y el medio acuático se utilizaba como indicación de contaminación fecal, tanto por su asociación con el tracto gastrointestinal de animales como por su resistencia a condiciones ambientales; sin embargo, se han encontrado altas concentraciones de enterococos en este medio en ausencia de contaminación fecal (Byappanahalli *et al.*, 2012).

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que los enterococos están presentes en prácticamente cualquier eslabón de la cadena alimentaria y en el ambiente, gracias a la capacidad que tienen de multiplicarse en condiciones muy extremas (Giraffa, 2002; Lebreton *et al.*, 2014). A esto también contribuye su extraordinaria versatilidad metabólica. Los enterococos pueden metabolizar un gran número de carbohidratos incluyendo hexosas, pentosas y ácidos orgánicos (poseen las tres rutas del metabolismo intermediario de carbohidratos: glucólisis, Entner-Doudoroff y ruta de las pentosas fosfato), glicerol, citrato, mucinas glicosiladas, polisacáridos vegetales (celulosa, pectina), rafinosa, quitina e, incluso, ácido láctico; además, estas capacidades se pueden compartir entre cepas de varias especies mediante la transferencia de elementos genéticos móviles (Zhang *et al.*, 2011). Esta propiedad explica la extraordinaria capacidad que tienen los enterococos para adaptarse a tantos ambientes distintos y colonizar un gran rango de hospedadores; con ello ganan habilidades para colonizar nuevos hospedadores y permitir, incluso, en determinadas ocasiones la transición del carácter comensal a patógeno (Ramsey *et al.*, 2014).

Por otra parte, los enterococos poseen una poderosa estrategia de supervivencia: las condiciones muy extremas de temperatura, concentración osmótica y/o radiación solar, así como la ausencia de nutrientes, inducen un estado metabólico que se denomina “viable pero no cultivable”. En este estado, que puede prolongarse hasta un año, las células experimentan ciertos cambios morfológicos y tienen actividad metabólica, aunque muy baja, pero no pueden multiplicarse. Es decir, no crecen en ciertos medios de laboratorio ni forman colonias visibles, por lo que pueden pasar desapercibidos en muchas muestras ambientales (Ramsey *et al.*, 2014).

II.1.2.3. Los enterococos en alimentos

Los enterococos se aíslan con mucha frecuencia de alimentos, tanto de origen vegetal como animal (Franz *et al.*, 2003). Las especies que se encuentran con mayor asiduidad son *E. faecalis* y *E. faecium* (Camargo *et al.*, 2014; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Giraffa, 2002; Pesavento *et al.*, 2014). Tienen un papel beneficioso en la elaboración de productos fermentados, bien como componentes de la microbiota propia de la materia prima alimentaria empleada y/o como cultivo iniciador, como se comentará más adelante. Pero, en algunos casos, también se han aislado como causa de alteración en productos cárnicos procesados sometidos a tratamientos térmicos suaves. Probablemente su termotolerancia les confiera una ventaja selectiva sobre otros posibles alterantes (Franz *et al.*, 2003).

La presencia de los enterococos es especialmente relevante en productos fermentados (embutidos y quesos) elaborados en los países mediterráneos con materias primas sin pasteurizar. De hecho, las peculiares características organolépticas de estos productos fermentados, considerados una exquisitez en algunos casos, se atribuyen a la presencia y crecimiento de los enterococos (Franz *et al.*, 2003; Giraffa, 2002). La capacidad de producir bacteriocinas con actividad frente a patógenos de origen alimentario es otra propiedad interesante de los enterococos ya que contribuye a la seguridad de los productos fermentados. La mayoría de estas bacteriocinas son producidas por las especies *E. faecium* y *E. faecalis* (Foulquié-Moreno *et al.*, 2003; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 2007; Giraffa, 1995). Una de las más estudiadas y prometedoras es la enterocina AS-48, una bacteriocina circular producida por una cepa de *E. faecalis* aislada originalmente de una muestra vaginal. Esta bacteriocina también la producen *E. faecalis* obtenidos de leche y quesos tradicionales que inhiben a un amplio rango de bacterias Gram-positivas y su efectividad se ha probado en numerosos sistemas alimentarios (Grande Burgos *et al.*, 2014). En el caso de la fabricación de queso fresco, las cepas bacteriocinogénicas tienen potencial como cultivos adjuntos para prevenir el crecimiento de patógenos indeseables como *Listeria monocytogenes* (Coelho *et al.*, 2014; Favaro *et al.*, 2014). Una estrategia similar se ha empleado para la elaboración de *rayeb*, un producto lácteo fermentado típico del norte de África, y de productos vegetales fermentados chinos (Liu *et al.*, 2014; Rehaiem *et al.*, 2012).

Las especies *E. faecium*, *E. faecalis* y *Enterococcus durans* son las que se aíslan con mayor frecuencia en quesos elaborados artesanalmente. La concentración en la que se encuentran en estos productos es relativamente elevada desde las primeras etapas de elaboración (10^4 - 10^6 ufc/g de cuajada) hasta el final de la maduración (10^5 - 10^7 ufc/g de queso) (Andrighetto *et al.*, 2001; Ogier y Serror, 2007).

La influencia de los enterococos en los productos fermentados depende de las propiedades específicas de cada cepa, entre las que se pueden destacar las actividades

proteolítica y lipolítica, la utilización del citrato y la producción de compuestos volátiles como diacetilo y acetoina (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Sarantinopoulos *et al.*, 2001). En conjunto, todos estos metabolitos contribuyen a la textura, sabor, aroma y seguridad de los alimentos fermentados (Franz *et al.*, 2003; Giraffa, 2002; Gomes *et al.*, 2010; Ogier y Serror, 2007). Este papel positivo de los enterococos ha potenciado su inclusión en algunos cultivos iniciadores o secundarios empleados para la elaboración de queso (Centeno *et al.*, 1996; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Parente *et al.*, 1989). Este es el caso, por ejemplo, de la cepa *E. faecium* K77D (Advisory Committee on Novel Foods and Processes, 1996).

Los enterococos también participan en otros procesos fermentativos de la industria alimentaria como, por ejemplo, los implicados en la elaboración de muchos embutidos, aceitunas y productos de soja (Bover-Cid *et al.*, 2001; Gardini *et al.*, 2001; Giraffa, 2000; Gomes *et al.*, 2008; Sabia *et al.*, 2003; Tanasupawat *et al.* 2008; Yoon *et al.*, 2008).

II.1.2.4. Comensales y patógenos

Probablemente uno de los rasgos que se asocian con mayor frecuencia a los enterococos es su dualidad. Durante mucho tiempo se consideraron como especies comensales habituales e inoñas de nuestro tracto gastrointestinal pero los datos epidemiológicos disponibles de las últimas décadas revelan que son importantes patógenos oportunistas, especialmente cuando se diseminan fuera del intestino. Actualmente, los enterococos son el tercer agente etiológico en importancia implicado en las infecciones nosocomiales (12% del total), incluyendo infecciones del tracto urinario, endocarditis, endoftalmitis y peritonitis, así como infecciones en el sistema nervioso central y sepsis en neonatos. *E. faecalis* y *E. faecium* son las especies más asociadas a estos efectos adversos; la mayoría de las infecciones están causadas por *E. faecalis* (80-90%), mientras que *E. faecium* es responsable de prácticamente el resto (10-15%) (Yuen y Ausubel, 2014).

La relevancia clínica de las infecciones causadas por los enterococos está relacionada con la dificultad de su tratamiento ya que, por una parte el aumento del número de cepas con resistencia a múltiples antibióticos en estas especies de enterococos agrava el problema (Franz, 2011) y, por otra parte, estos microorganismos forman con gran rapidez biopelículas de una resistencia extrema (Figura 8). *E. faecalis* posee gran número de factores implicados en la formación de estas biopelículas, lo cual puede explicar su predominio en las infecciones nosocomiales. La formación de una biopelícula es un proceso complejo que se inicia con la unión de una única célula a una superficie (célula o material) y acaba con la creación de una estructura tridimensional de sustancias poliméricas extracelulares en la que se encuentran dispersas microcolonias bacterianas. Las células que se encuentran formando parte de estas biopelículas son extremadamente resistentes a la fagocitosis y a los antibióticos.

La proximidad entre células facilita enormemente el intercambio de material genético. (Paganelli *et al.*, 2012).

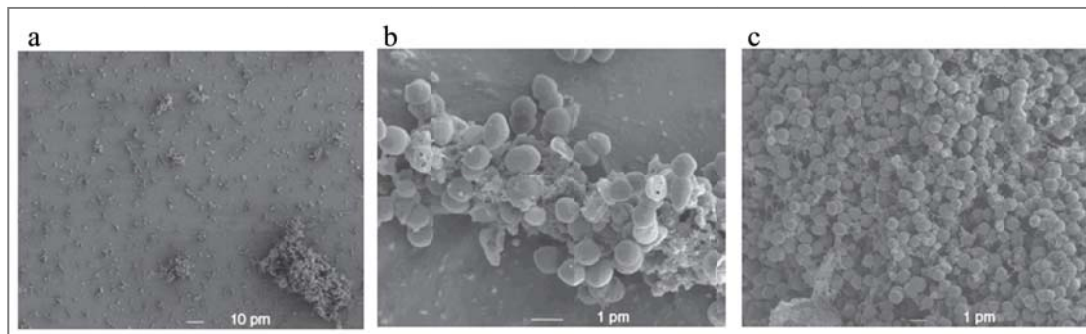


Figura 8. Fotografías de microscopía electrónica mostrando la formación de una biopelícula por *E. faecium* E1162, una cepa clínica, en vidrio cubierto con poli-L-lisina. (a) Al cabo de 4 h ya se pueden apreciar células aisladas adheridas y una microcolonia (en la esquina inferior derecha); (b) microcolonia formada después de 24 h en la que las células probablemente se mantienen juntas gracias al exopolisacárido producido por las bacterias; y (c) biopelícula madura después de 72 h. Fuente: Paganelli *et al.* (2012).

A diferencia de otras bacterias, los enterococos no producen potentes toxinas proinflamatorias, pero poseen diversos factores de virulencia relacionados con su patogenicidad (Figura 9). Estos factores, a menudo, les permiten colonizar un determinado nicho ecológico, evadir la respuesta inmunológica y reducir la respuesta inmunitaria del huésped. Muchos de ellos intervienen, precisamente, en la formación de las biopelículas mencionadas anteriormente (Paganelli *et al.*, 2012). Por otra parte, algunos de estos factores, a pesar de su denominación, se encuentran tanto en aislados recuperados de infecciones clínicas como en otros aislados obtenidos de individuos sanos, como por ejemplo la citolisina y la gelatinasa (Arias y Murray, 2012). Entre los factores de virulencia de los enterococos cabe citar la presencia de proteínas en la superficie celular que están implicadas tanto en la adhesión a las células del hospedador o a otras bacterias o superficies, como las proteínas de la sustancia de agregación, el antígeno A de pared celular (EfaA), la adhesina de unión al colágeno (Ace en *E. faecalis* y Acm en *E. faecium*), la proteína de superficie de enterococos (Esp) o la proteína enterocócica con repeticiones ricas en leucina (ElrA).

Los enterococos también poseen fimbrias y pili que son estructuras formadas por proteínas, que contienen motivos LPxTG y plegamientos característicos de inmunoglobulinas y participan en la adhesión y la conjugación bacteriana; los genes que codifican estas proteínas se encuentran en operones junto con sortasas que intervienen en su ensamblaje. Algunas cepas de *E. faecalis*, especialmente las que se encuentran en ambiente hospitalario, poseen una cápsula polisacáridica que está

relacionada con la evasión de la fagocitosis (Thurlow *et al.*, 2009). Los glicolípidos de la membrana celular, como el α -diglucosil diacilglicerol, y el ácido lipoteitoico también intervienen en la adhesión de los enterococos a los enterocitos.

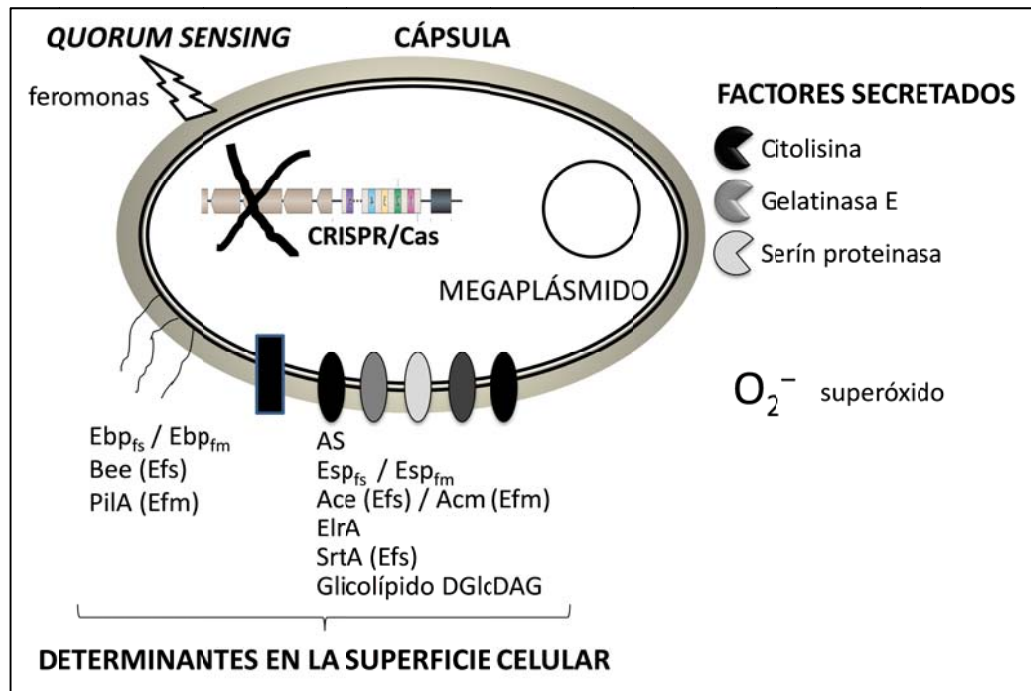


Figura 9. Esquema de los principales factores de virulencia descritos en *E. faecalis* y *E. faecium*. Ace/Acm, adhesinas de unión al colágeno; Bee, pili; CRISPR/Cas, repeticiones palindrómicas cortas separadas entre sí por otras secuencias no repetidas y genes asociados (del inglés, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR Associated Genes*); DGlcDAG, α -diglucosil diacilglicerol; Ebp, fimbrias adhesivas; ElrA, proteína enterocócica con repeticiones ricas en leucina; Esp, proteína de superficie involucrada en la evasión del sistema inmunológico; Pila, pili; AS, proteínas de la sustancia de agregación; SrtA, sortasa; El subíndice fs o la abreviatura Efs indica que se ha descrito en *E. faecalis*, mientras que el subíndice fm o la abreviatura Efm indica que se ha descrito en *E. faecium*.

Además, los enterococos secretan varias proteínas al medio extracelular, también implicadas en su virulencia, como citolisina y proteinasas (gelatinasa y serín proteinasa) que, gracias a su capacidad hidrolítica, pueden degradar los tejidos. A esta degradación también puede contribuir el superóxido que producen en abundancia, sobre todo en el caso de las cepas invasivas, un rasgo que no suele ser habitual en otras bacterias (Huycke *et al.*, 2001).

Muchos de estos factores de virulencia están codificados en genes agrupados en ciertas regiones del genoma que van desde operones (como los genes que codifican la

gelatinasa o la producción de feromonas) hasta islas de patogenicidad que reúnen los genes necesarios para la producción de varios factores de virulencia. Además, los genes de algunos factores de virulencia se encuentran codificados en plásmidos transmisibles, lo que facilita su intercambio entre cepas. De hecho, la secuenciación del genoma de *E. faecalis* V583, el primer aislado clínico resistente a la vancomicina identificado en EE.UU., ha puesto de manifiesto que posee una gran cantidad de información genética relevante en elementos genéticos móviles (fagos, plásmidos, islas de patogenicidad) y que, aproximadamente, el 25% de su material genético ha sido adquirido (Polidori *et al.*, 2011). Esto confirma que el intercambio genético es muy común entre los enterococos, especialmente en los aislados de instalaciones hospitalarias (Kristich *et al.*, 2014). En cambio, *E. faecalis* OG1RF, una cepa comensal, carece de elementos genéticos móviles y de DNA adquirido (Bourgogne *et al.*, 2008). La pérdida del sistema de defensa CRISPR/Cas del genoma frente a la entrada de DNA extraño en la célula se correlaciona con la acumulación de rasgos de resistencia y virulencia y explica, al menos en parte, la evolución de estos comensales a patógenos mediante la adaptación a nuevos nichos ecológicos antropogénicos (Gilmore *et al.*, 2013).

La comparación del genoma de 31 cepas de *E. faecium* y 38 de *E. faecalis*, incluyendo cepas de diversos orígenes, ha puesto de manifiesto que los aislados de *E. faecium* no clínicos se agrupaban en dos clados (conjuntos de organismos emparentados con un antepasado común) claramente separados de los aislados clínicos. También se confirma lo observado con anterioridad referente a que los genomas de los aislados no clínicos de *E. faecium* son significativamente más pequeños que los genomas de los aislados clínicos y contienen muchos menos elementos genéticos móviles, factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos. Y no sólo eso, sino que los aislados clínicos están dotados con diferentes características funcionales que los no clínicos, lo que indica una adaptación a su nicho ecológico. Por otro lado, el tamaño medio del genoma de *E. faecalis* ($3.000,8 \pm 143,0$ kb) es mayor, contiene más genes conservados que el de *E. faecium* ($2.847,2 \pm 122,1$ kb) y no se observan diferencias en función de que su origen sea clínico o no. De hecho, todas las cepas de *E. faecalis* examinadas constituyen un linaje específicamente adaptado al tracto gastrointestinal (Kim y Marco, 2014).

Por último, la problemática sanitaria de los enterococos no depende únicamente de las características de estas bacterias (adaptabilidad a ambientes inhóspitos, resistencia a compuestos antimicrobianos o la capacidad para adquirir y diseminar los determinantes genéticos de dichos compuestos) sino, también, del estado del hospedador. Los enterococos suelen ocasionar infecciones graves en individuos cuyo sistema inmunológico está comprometido, con dispositivos mecánicos (especialmente catéteres, donde los enterococos forman biopelículas con facilidad) y sometidos a tratamiento con múltiples antimicrobianos.

II.1.2.5. Resistencia a antibióticos

Un rasgo característico de los enterococos, y que en gran medida determina su importancia clínica, es su alta resistencia a muchos agentes antimicrobianos empleados habitualmente en el tratamiento de infecciones, en comparación con otros patógenos de interés, y su facilidad para adquirir nuevas resistencias y mutaciones que le confieran resistencia a otros antimicrobianos (Dzidic y Bedekovic, 2003; Huycke *et al.*, 1998).

Los mecanismos de resistencia a antimicrobianos son muy diversos e incluyen mutaciones que cambian la permeabilidad al antibiótico o modifican la diana contra la que debería actuar, la producción de enzimas que inactivan al antibiótico o la posesión de sistemas de bombeo que expulsan el antibiótico de la célula mediante un sistema de transporte activo (Figura 10). La resistencia natural intrínseca de *E. faecium* a la ampicilina se debe a la producción de la proteína 5 de unión a penicilina (PBP5, del inglés *Penicillin-Binding Protein 5*), que tiene baja afinidad por los antibióticos β -lactámicos. Los aislados clínicos, principalmente de *E. faecium*, han desarrollado una resistencia elevada a la ampicilina, asociada a la sobreproducción de PBP5. Se ha descrito la resistencia de alto nivel a aminoglucósidos en algunas cepas de *E. faecium* debido a la producción de una β -lactamasa que inactiva a estos antibióticos y que es idéntica a la β -lactamasa de tipo A producida por *Staphylococcus aureus* (Cercenado, 2011).

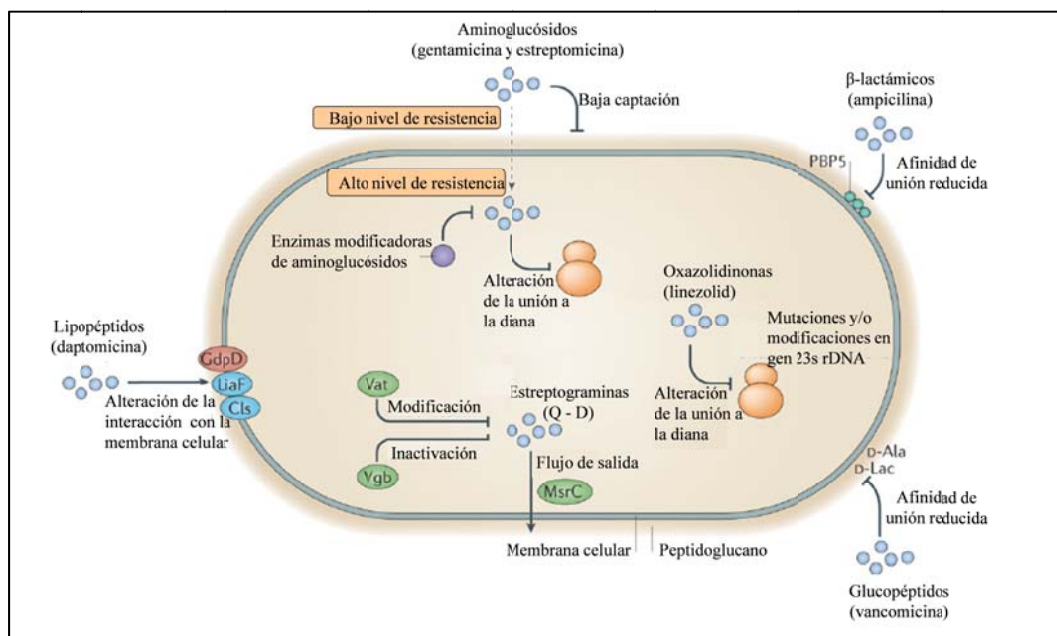


Figura 10. Principales mecanismos de resistencia a antimicrobianos en el género *Enterococcus*. CIs, cardiolipina sintasa; GdpD, familia glicerofosforil diéster fosfodiesterasa; LiaF, proteína que interfiere con el lípido II; MsrC, proteína de resistencia a macrólidos y estreptograminas; PBP5, Proteína 5 de unión a penicilina; Q-D: quinupristina-dalfopristina; Vat, virginiamicina acetiltransferasa; Vgb, virginiamicina B liasa. Fuente: Arias y Murray (2012).

Los enterococos también tienen una resistencia intrínseca de bajo nivel a los aminoglucósidos, como la estreptomicina o la gentamicina, porque su transporte al interior de la célula, al ser moléculas muy polares, es muy escaso. En el caso de la estreptomicina, la resistencia también se debe a mutaciones en la subunidad 30S del ribosoma que modifican el sitio de unión (Arias y Murray, 2011).

La resistencia adquirida a glucopéptidos, en concreto a la vancomicina, se produce gracias a un mecanismo bien caracterizado relacionado con la menor afinidad de la unión de la vancomicina por alteración de la ruta biosintética del peptidoglicano, que es la diana de este antibiótico. Existen múltiples y diferentes mecanismos genéticos que dan lugar a resistencia a este antibiótico, habiéndose descrito hasta 8 operones (*vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* y *vanN*) que determinan la resistencia adquirida a la vancomicina y uno que media la resistencia intrínseca (*vanC*). La resistencia transmisible a la vancomicina es la que más ha preocupado por su diseminación a nivel mundial y su posible transferencia a *S. aureus* y otros patógenos. En EE. UU., los enterococos resistentes a los glucopéptidos (ERG) se aislaban principalmente de pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos donde había un amplio uso de este antibiótico. Sin embargo, en Europa los enterococos ERG se aíslan con mayor frecuencia de animales de granja y alimentos, probablemente debido al uso que se hizo como promotor del crecimiento en animales de abasto.

La resistencia de los enterococos a la estreptogramina quinupristina-dalfopristina implica varias rutas, incluyendo la modificación del antibiótico por la enzima virginiamicina acetiltransferasa, la inactivación por parte de la virginiamicina B liasa o el transporte a través de la membrana por una bomba de expulsión activa (proteína de resistencia a macrólidos). La resistencia a las oxazolidinonas es rara, pero cuando se produce se debe a una mutación en la subunidad 23S del ribosoma, que impide su unión. En el caso del lipopéptido daptomicina, la resistencia se asocia a una alteración en la membrana celular, porque su acción requiere una proteína de membrana, y en enzimas implicadas en el metabolismo de los fosfolípidos.

La resistencia de los enterococos a ciertos antibióticos guarda una estrecha relación con el aumento de las infecciones nosocomiales en las que están implicados. Ciertos componentes de las bacterias Gram-negativas (ácido lipoteicoico, lipopolisacáridos y flagelina) son reconocidos por los receptores de tipo Toll y Nod expresados en la superficie de las células intestinales y de Paneth y estimulan la producción de REGIII γ por parte de las células de Paneth. REGIII γ es una lectina de tipo C que destruye selectivamente a las bacterias Gram-positivas, entre las que se incluyen los ERG. La administración de antibióticos con actividad frente a bacterias Gram-negativas, y la consiguiente disminución de la población de este grupo de bacterias se traduce en una menor producción de REGIII γ por parte de las células de Paneth y un sobrecrecimiento de los ERG. Precisamente, este sobrecrecimiento intestinal de los ERG facilita su translocación y diseminación por vía sanguínea a otras

localizaciones. Ante esta situación se ha propuesto explotar el antagonismo entre los enterococos y otros microorganismos como una posible solución, para controlar el sobrecrecimiento intestinal de ERG. En un estudio reciente se comprobó que la reintroducción de una microbiota diversa en el tracto gastrointestinal de ratones fuertemente colonizados con ERG provocaba una importante reducción de los mismos, siendo *Barnesiella* (un comensal anaerobio obligado) el género más activo. La modulación de la microbiota intestinal podría constituir una posible solución al problema de los ERG (Arias y Murray, 2010; Ubeda *et al.*, 2010; Ubeda *et al.*, 2013).

Hasta mediados de la década de los 90, *E. faecalis* representaba aproximadamente el 95% de los aislados clínicos del género pero la proporción de aislados clínicos de *E. faecium* ha ido aumentando en los últimos años. Actualmente, estas dos especies son las más frecuentes en las infecciones nosocomiales y son una gran preocupación en las instalaciones hospitalarias (Arias y Murray, 2012; Gilmore *et al.*, 2013). La gran mayoría de las infecciones debidas a *E. faecium* a nivel mundial se deben a un linaje denominado complejo clonal 17 (CC17). El origen de este linaje CC17 es anterior al uso clínico de antibióticos por lo que se piensa que, más que un microorganismo desarrollado por la presión selectiva de los antibióticos, es un oportunista que está especialmente dotado para sobrevivir y predominar en la era de los antibióticos en un nicho ecológico muy especial (pacientes inmunocomprometidos a los que se les administran grandes cantidades de antibióticos durante mucho tiempo) (Galloway-Peña *et al.*, 2011; Kristich *et al.*, 2014). Otras especies, como *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. hirae*, *E. mundtii* o *E. raffinosus*, también se han aislado de infecciones humanas pero en menor medida y, en general, no presentan problemas de multirresistencia a antibióticos (Devriese *et al.*, 1994; Hammerum, 2012).

Tradicionalmente, se ha asociado el consumo de antimicrobianos con la expansión clonal de las cepas resistentes a antibióticos, siendo representativos los casos de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* productores de β -lactamasas de amplio espectro o *S. aureus* resistentes a la meticilina. Sin embargo, en el caso de los enterococos la diseminación clonal de bacterias resistentes a antimicrobianos no está totalmente ligada al uso de antimicrobianos en un huésped o país en particular y tiene lugar tanto en producción animal como en humanos y tanto en patógenos como en comensales (ECDC/EFSA/EMA, 2015). Como ejemplo puede citarse la expansión clonal de ERG en pollos broilers en Suecia observada desde el año 2000 (Nilsson *et al.*, 2009). En este país la proporción de muestras positivas con ERG aumentó gradualmente desde <1%, en el año 2000, a algo más del 40% en 2005. La identificación de la especie, la determinación de la sensibilidad a antibióticos, el genotipado de la resistencia a vancomicina y la caracterización del transposón Tn1546 (responsable de la transmisión de la resistencia a alto nivel a la vancomicina en enterococos) en los ERG aislados demostró que todos pertenecían a la especie *E. faecium* y portaban un gen de resistencia a vancomicina (*vanA*). El antibiograma de la

mayoría de los aislados era similar y poseían idénticos perfiles de tipado de secuencias multilocus (MLST, del inglés *Multilocus Sequencing Typing*) y Tn1546. Es decir, el aumento de la incidencia de ERG en pollos en Suecia entre 2000 y 2005 se debía a la diseminación de un clon. Curiosamente, en este país no se emplea la avoparcina en la producción avícola desde 1986. Por lo tanto, esta expansión clonal se produjo sin que existiese una presión selectiva por el uso de antibióticos (Nilsson *et al.*, 2009).

II.1.2.6. Los enterococos como probióticos

Otro de los aspectos de interés de los enterococos es su potencial para ser usados como probióticos, siendo el género más utilizado después de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, sobre todo algunas cepas pertenecientes a las especies *E. faecium* y *E. faecalis* (Coeuret *et al.*, 2004; Kuritza *et al.*, 2011). Los enterococos presentan varias de las características deseables en microorganismos utilizados como probióticos, tales como la resistencia a los jugos gástricos y sales biliares (Rossi *et al.*, 2003) y la producción de compuestos antimicrobianos (Franz *et al.*, 1999; Saarela *et al.*, 2000).

El empleo de enterococos como probióticos está permitido en algunos países, sirviendo como ejemplos las cepas *E. faecium* SF68 (NCIMB10415, producida por Cerbios-Pharma SA, Barbengo, Suiza) y *E. faecalis* Symbioflor 1 (SymbioPharm, Herborn, Alemania). Estas dos cepas se comercializan como complementos alimenticios en forma de preparaciones medicamentosas (Franz, 2011). Una de sus principales aplicaciones es el tratamiento de diarreas asociadas a antibióticos. La eficacia de la cepa *E. faecium* SF68 probablemente esté basada en que se trata de un comensal del tracto gastrointestinal y que requiere un tiempo muy corto de generación (aproximadamente 20 minutos en condiciones óptimas). Además, esta cepa tiene actividad inhibidora frente a *E. coli*, varios serovares de *Salmonella*, *Shigella* spp. y *Enterobacter* spp. y es resistente *in vitro* a pH ácido y alta concentración de sales biliares (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Franz, 2011).

Los enterococos también regulan las alteraciones de la microbiota intestinal y contribuyen a estabilizar la población autóctona, aliviando los síntomas asociados al síndrome de intestino irritable (McFarland y Dublin, 2008). Otra aplicación de los enterococos como probióticos es la reducción de los niveles de colesterol debido a la actividad hidrolasa de sales biliares, muy común entre los aislados de *E. faecium* y *E. faecalis* (el 50 y el 85% de los aislados, respectivamente, poseen esta actividad) (Franz *et al.*, 2001a); son varios los ensayos que han explorado esta aplicación (Agerholm-Larsen *et al.*, 2000; Hlivak *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 1999). Un número limitado de ensayos también ha demostrado la eficacia de *E. faecalis* Symbioflor 1 en la regulación de la inmunidad del huésped, pero es necesario recabar más pruebas que confirmen estos resultados (Franz *et al.*, 2011).

Las dos cepas probióticas de enterococos mejor caracterizadas hasta la fecha son las anteriormente mencionadas, *E. faecium* SF68 y *E. faecalis* Symbioflor 1, que llevan más de 20 años usándose sin que se haya registrado ningún efecto adverso a pesar de que el consumo de altas dosis está muy extendido. *E. faecium* SF68 no posee ningún plásmido que responda a feromonas ni contiene el gen responsable de la síntesis de la sustancia de agregación (Franz *et al.*, 2011). En cuanto a *E. faecalis* Symbioflor 1 se conoce la secuencia completa de su genoma que es muy similar a la de la cepa patógena *E. faecalis* V583, excepto en una gran región genómica. Esta región, que estaba ausente en la cepa probiótica, contiene diversos genes considerados como factores de virulencia (citolisina, proteína de superficie de enterococos, gelatinasa, hialuronidasa, enterocina AS-48). En cambio, sí se detectaron en *E. faecalis* Symbioflor 1 otros determinantes que pueden ser relevantes como factores de colonización al darle una ventaja competitiva (producción de la sustancia agregante, proteína de adhesión a colágeno, formación de cápsula o resistencia a especies reactivas de oxígeno) (Domann *et al.*, 2007).

En general, los estudios que exploran el potencial probiótico de los enterococos en humanos son más escasos que los relacionados con las aplicaciones para nutrición animal. Los enterococos han sido utilizados en piensos desde finales de la década de los 80 por el efecto positivo que tienen en la microbiota intestinal, especialmente en los individuos jóvenes y en el periodo de destete. Este efecto favorable se manifiesta como un mejor estado de salud, con menos diarreas, y un mayor rendimiento (Becquet, 2003). La utilización de probióticos en producción animal (ganado porcino, aviar, bovino) tiene otra ventaja asociada a la reducción de patógenos zoonóticos en el tracto gastrointestinal de los animales, limitando la transmisión de estos patógenos a través de los alimentos. Paralelamente ha surgido otra importante área de aplicación de los probióticos en el ámbito veterinario y es su uso en animales de compañía para estimular su sistema inmunológico (Franz *et al.*, 2011).

Puesto que aproximadamente un tercio de los microorganismos que se añaden a los piensos son cepas de *E. faecium*, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, del inglés *European Food Safety Agency*) ha establecido los criterios de seguridad que se deben controlar en las cepas para las que se pretenda pedir autorización de empleo. Entre los rasgos que la EFSA considera que discriminan entre cepas seguras y cepas que podrían causar infección en el hombre se encuentra la resistencia a la ampicilina (las cepas seguras deben tener un valor de concentración mínima inhibitoria (CMI) ≤ 2 mg/L) y la ausencia de la forma alélica *pbp5-R* del gen *pbp5*, que está ligada a la resistencia a ampicilina y presente en prácticamente todos los aislados de infecciones clínicas. Además, las cepas deben carecer de otros factores de virulencia y marcadores asociados con las cepas hospitalarias como son: a) elementos *IS16*, que son los transposones más sencillos que codifican las enzimas necesarias para su propia transposición; b) el gen *esp*, que codifica la proteína de superficie de enterococos (Esp) y es parte de un islote de patogenicidad de gran

tamaño que también lleva los genes necesarios para su movilización; y c) el gen *hyl_{Efm}* que codifica una glicosil hidrolasa (previamente anotada como hialuronidasa) que facilita la colonización intestinal y está codificada en un plásmido de gran tamaño (EFSA, 2012).

A pesar del efecto probiótico probado de los enterococos en numerosas especies animales y aplicaciones, su implicación en diversas infecciones, el aumento de la resistencia a antibióticos, la variabilidad en la presencia de factores de virulencia y su capacidad para intercambiar elementos genéticos han determinado que algunos investigadores planteen dudas razonables sobre la conveniencia de su uso comercial (Lebreton *et al.*, 2014). Estas dudas podrán disiparse realizando estudios minuciosos sobre la seguridad (ausencia de resistencia a antibióticos y factores de virulencia que pudieran comprometer la salud del consumidor) y las propiedades beneficiosas de forma individual para cada cepa (Frank *et al.*, 2011; Lopez *et al.*, 2009; Ogier y Serror, 2008).

II.2. LAS BACTERIAS LÁCTICAS EN LOS PRODUCTOS LÁCTEOS FERMENTADOS

La fermentación es uno de los métodos más antiguos e importantes empleados para la conservación de la leche. De hecho, los productos lácteos fermentados han constituido una parte esencial de la dieta humana en muchas regiones del mundo desde tiempos inmemoriales. La fermentación permite la conservación de los nutrientes presentes en la leche durante períodos de tiempo más largos y contribuye a su seguridad microbiológica al inhibir el crecimiento de patógenos (Figura 11). Al mismo tiempo, los productos lácteos fermentados presentan unas características organolépticas más atractivas que las de la materia prima original: generalmente tienen una consistencia más viscosa o dura, una textura suave y un sabor agradable y característico (Chandan, 2013).

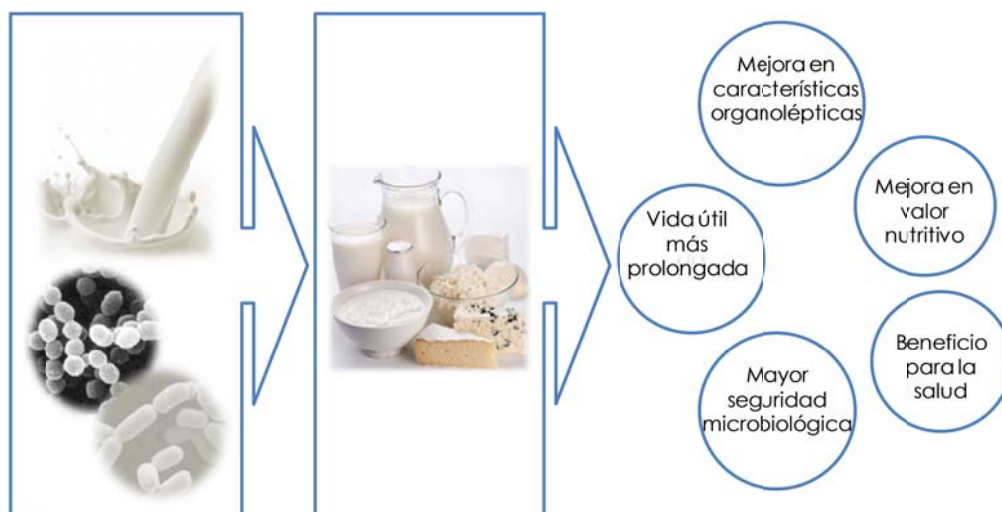


Figura11. Beneficios potenciales de los productos lácteos fermentados

La fermentación todavía sigue siendo una buena opción para prolongar la vida útil de la leche en países en vías de desarrollo o en comunidades rurales con recursos limitados porque no requiere una tecnología y un equipo muy sofisticados (Guizani y Mothershaw, 2007). Sin embargo, con el avance de otros métodos de conservación de los alimentos, en los países desarrollados la fermentación tiene más importancia por los profundos cambios que ocasiona en las características organolépticas de la materia prima. Por otra parte, la fermentación suele mejorar la digestibilidad y el valor nutritivo y/o funcional de la leche como consecuencia de la degradación de la lactosa o la producción de ciertos nutrientes (como vitaminas) y/o compuestos con actividad biológica (Figura 11) (Chandan, 2013).

En el mundo se elaboran a partir de la leche y gracias a la fermentación más de 1000 productos que tienen una gran diversidad de sabores, aromas, texturas y apariencias (Chandan, 2013). Esos rasgos dependen principalmente de la actividad de enzimas y de los metabolitos producidos por distintos microorganismos. En la fermentación de la leche pueden intervenir mohos, levaduras y bacterias, aunque los microorganismos más frecuentes son las BAL por su capacidad para producir ácido láctico. Sin embargo, el papel de estas bacterias no se limita a la acidificación, ya que participan, al mismo tiempo, en el desarrollo de otras características organolépticas del producto fermentado (Figura 11). Precisamente es el impacto de estas reacciones secundarias en las propiedades sensoriales de los alimentos lo que a menudo diferencia unos productos fermentados de otros similares y contribuye sensiblemente a su valor comercial (Johnson y Steele, 2013).

Por otra parte, los productos lácteos fermentados también proporcionan al consumidor cantidades significativas de microorganismos vivos que pueden aportar un beneficio para la salud más allá de la nutrición convencional (Fernández *et al.*, 2015) (Figura 11). Además, sirven como vehículo de bacterias probióticas que, de hecho, han estado asociadas habitualmente con los productos lácteos. Esta relación tiene gran importancia porque los consumidores son cada vez más conscientes del impacto positivo que tiene en su salud la ingesta de alimentos conteniendo microorganismos vivos beneficiosos.

II.2.1. Cultivos iniciadores

Tradicionalmente la fermentación de la leche era consecuencia de la acción de microorganismos que se encontraban en la materia prima o en el ambiente, favoreciendo su multiplicación. Evidentemente la calidad del producto fermentado obtenido quedaba a merced del tipo y número de microorganismos presentes. Por ello, este proceder da lugar a productos muy poco uniformes y, en ocasiones, con defectos. Esta técnica se mejoró mediante el procedimiento de inocular un nuevo lote de materia prima con una pequeña cantidad de un producto fermentado con características adecuadas (*back-slopping*). De esta forma se añade una mayor cantidad de las bacterias mejor adaptadas y se logra acortar la fermentación y reducir el riesgo de una fermentación fallida (Leroy y De Vuyst, 2004).

Sin embargo, la progresiva industrialización de la tecnología de elaboración de los productos lácteos fermentados, con la incorporación de la mecanización, el aumento del tamaño de las fábricas, la utilización de leche pasteurizada, la necesidad de flujos tecnológicos más cortos y el aumento en el volumen de leche procesada, requiere que las BAL implicadas en la acidificación lo hagan a una velocidad adecuada y predecible (Johnson y Steele, 2013; Franklin, 1998). Por un lado, una rápida producción de ácido permitirá controlar los posibles microorganismos contaminantes presentes en una materia prima y un ambiente que distan mucho de ser estériles. Y, por

otro, las propiedades organolépticas (textura, sabor y aroma) de los productos lácteos fermentados también dependen en gran medida de la velocidad de acidificación y de la cantidad de ácido producida por las BAL. Además, a nivel industrial es fundamental que las características organolépticas del producto final sean constantes. Esto ha determinado que a nivel industrial la fermentación esté dirigida por uno o más microorganismos perfectamente caracterizados que forman parte de un cultivo iniciador (*starter culture*). Un cultivo iniciador se puede definir como una preparación que contiene un elevado número de células de uno o más microorganismos que se añaden a una materia prima alimentaria cruda o pasteurizada (en nuestro caso, la leche) para iniciar, acelerar y dirigir su rápida fermentación (Leroy y De Vuyst, 2004).

Los cultivos iniciadores para la elaboración de productos lácteos fermentados generalmente están constituidos por BAL seleccionadas por su capacidad para proliferar rápidamente en las primeras horas del proceso tecnológico; deben, además, producir una cantidad abundante de ácido láctico para disminuir el pH, que es su función primordial, y un correcto sabor y aroma en el producto (Hassan y Frank, 2001).

Existen varios criterios para la clasificación de los cultivos iniciadores, teniendo en cuenta aspectos tecnológicos como la velocidad de acidificación, la producción de compuestos aromáticos o la actividad proteolítica. Sin embargo, la clasificación más utilizada es en función de la temperatura de crecimiento y su composición. El rango de temperatura óptima de crecimiento para los cultivos mesófilos, formados fundamentalmente por bacterias de los géneros *Lactococcus* y *Leuconostoc*, es 30-35°C. En estos cultivos la producción de ácido disminuye mucho, e incluso desaparece, a temperaturas inferiores a 20°C. Son los que se utilizan para elaborar quesos en los que no se aplican temperaturas altas, como por ejemplo los quesos frescos. Los cultivos termófilos utilizados en la industria láctea requieren temperaturas en el rango 40-45°C, aunque pueden sobrevivir a temperaturas superiores a los 55°C, y contienen especies de los géneros *Streptococcus* y *Lactobacillus*; el más corriente es el cultivo mixto de *Str. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* empleado para la elaboración de yogur (Hill y Kethireddipalli, 2013). Además, puede tratarse de cultivos puros (una cepa de una especie definida), cultivos múltiples (mezclas definidas de varias cepas) o cultivos mixtos (mezclas poco definidas de cepas escasamente caracterizadas). En la Tabla 5 se muestran algunos cultivos iniciadores empleados en la fabricación de distintos productos lácteos fermentados.

Los cultivos mesófilos, a su vez, se pueden clasificar en cultivos LD y cultivos O. Los denominados LD están formados por especies de *Leuconostoc* (L) y de *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (D), que son capaces de fermentar el citrato y formar compuestos aromáticos; se emplean en la elaboración de quesos semi-duros (como Gouda o Tilsitter) y blandos (como Camembert o Port Salut). Los cultivos O están compuesto por cepas acidificantes que no producen CO₂; están involucrados en

la producción de quesos como Cheddar, Feta o Cottage, en los que tienen un papel primordial en la formación del aroma y sabor y los “ojos” característicos de algunos de ellos (Hoier *et al.*, 1999; 2010).

Tabla 5. Cultivos iniciadores empleados en la elaboración de productos lácteos fermentados.

Producto	Cultivo iniciador
Quesos duros con “ojos”	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
Quesos con “ojos” pequeños	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i>
	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
	<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
Quesos tipo italiano y suizo	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>
	<i>L. helveticus</i>
	<i>L. casei</i>
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
	<i>Str. thermophilus</i>
Mantequilla y mazada	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i>
	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
Yogur	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
	<i>Str. thermophilus</i>
Leches fermentadas	<i>L. casei</i>
	<i>L. acidophilus</i>
	<i>L. rhamnosus</i>
	<i>L. johnsonii</i>
Kéfir	<i>L. kefir</i>
	<i>L. kefiranofaciens</i>
	<i>L. brevis</i>

II.2.2. Cultivos adjuntos o secundarios

En algunos productos lácteos podemos encontrar una microbiota secundaria, formada por otros microorganismos muy variados desde el punto de vista taxonómico y con actividades metabólicas muy complejas, que es esencial para el desarrollo de las características organolépticas del producto final. Entre los miembros de esta microbiota secundaria es habitual encontrar una mezcla de otras BAL, distintas a las integrantes del cultivo iniciador y entre las que destacan bacterias de los géneros

Lactobacillus, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Leuconostoc*, así como levaduras y mohos. La concentración de BAL distintas al cultivo iniciador suele ser escasa en las primeras etapas de la fermentación, pero aumenta mucho (alrededor de cuatro y cinco órdenes de magnitud) en los productos que tienen un periodo de maduración largo, como algunos quesos. Esta microbiota secundaria tiene un papel muy relevante en la producción de compuestos aromáticos y sápidos distintivos (Settani y Moschetti, 2010).

II.2.3. Probióticos

Existe un tercer tipo de microorganismos que, en ocasiones y en respuesta a la demanda de productos que tengan un impacto positivo en la salud del consumidor, se añade a los productos lácteos: los probióticos (Roos *et al.*, 2002). Los principales probióticos asociados con los productos lácteos pertenecen al grupo de las BAL, siendo *Lactobacillus* el género más utilizado, y a las bifidobacterias (Tabla 6). Aunque las cepas utilizadas como cultivos iniciadores o secundarios pueden tener cualidades probióticas, generalmente se consideran más apropiadas otras seleccionadas por criterios relacionados con su eficacia (como la adherencia a células intestinales o la supervivencia al paso por el tracto gastrointestinal) (Gilson *et al.*, 1994).

Tabla 6. Especies que contienen cepas empleadas como probióticos.

<i>Lactobacillus</i>	Otras bacterias lácticas	<i>Bifidobacterium</i>	Otros microorganismos
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. casei</i>	<i>Lc. lactis</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Propionibacterium freundenreichii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i>	<i>B. breve</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>Str. thermophilus</i>	<i>B. longum</i>	
<i>L. helveticus</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>		
<i>L. gallinarum</i>			
<i>L. gasseri</i>			
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

Fuente: Kailasapathy, 2013

Por otra parte, los productos lácteos se consideran un buen vehículo para la administración de probióticos porque la mayoría pueden utilizar la lactosa como fuente de energía para su crecimiento. Además, los componentes de la leche les proporcionan

cierta protección durante su tránsito por el tracto gastrointestinal (Charteris *et al.*, 1998). De hecho, la mayor parte de los alimentos probióticos comercializados tienen una base láctea, y en concreto se trata de leches fermentadas, aunque también se han añadido probióticos a productos lácteos fermentados congelados, leche en polvo, queso, helado y productos no lácteos como zumos de fruta o productos de soja (Nagpal *et al.*, 2011). La elección de la matriz alimentaria es de gran importancia por su efecto en la expresión de algunas características probióticas clave (Sanders y Marco, 2010).

En los probióticos no se busca que tengan capacidad de acidificar rápidamente o desarrollar características organolépticas adecuadas en el producto, sino que proporcionen un beneficio para la salud, aunque el producto final deba tener unas características sensoriales que hagan agradable su consumo a lo largo de toda su vida útil (Holzpfel *et al.*, 1998). Inicialmente los probióticos se utilizaban para modular la microbiota intestinal. Sin embargo, en los últimos años la lista de beneficios asociados al consumo de probióticos se ha expandido notablemente para abarcar numerosos efectos extraintestinales entre los que se incluyen, incluso, algunos relacionados con el estado de ánimo, ansiedad y salud mental (Figura 11) (Lozano, 2002; Torres, 1999; Nagpal *et al.*, 2011; Slyepchenko *et al.*, 2015). Lamentablemente, en ocasiones los probióticos se han incluido, y todavía se sigue haciendo hoy día, en alimentos sin haber sido seleccionados por tener un efecto en particular, sino por el mero hecho de poder declarar que el producto contiene un probiótico (Gilliland, 2001).

La comunidad científica ha establecido que en el producto final debe haber una concentración mínima de probiótico de 10^6 - 10^7 ufc/g (Talwalkar *et al.*, 2004). De esta forma, con un consumo de 100 ml (o g) del producto se ingieren entre 10^8 y 10^9 bacterias, que es el mínimo recomendado para que proporcionen beneficios a la salud en el hombre (Jyamanne y Adams, 2006). Esto significa que su viabilidad debe mantenerse en todas las etapas del flujo tecnológico desde su fabricación hasta su ingestión por el consumidor, además de ser capaces de sobrevivir al paso por el tracto gastrointestinal (Sanz, 2007). Para que los microorganismos lleguen vivos al intestino tienen que atravesar un duro camino a través del medio ácido del estómago y el posterior contacto con la bilis cuando llegan al intestino delgado.

Generalmente se ha considerado que una propiedad importante de los probióticos es la adhesión a los tejidos del hospedador puesto que facilitará algunas de las acciones de los probióticos, como por ejemplo la estimulación del sistema inmunológico. De hecho, debe ser muy ventajoso para ejercer su efecto en el medio intestinal, donde el número de los probióticos ingeridos es muy inferior al de la microbiota residente. Algunos autores han cuestionado la necesidad de que las células sean viables para que el probiótico ejerza algunos efectos, como por ejemplo la adhesión a las mucosas (Lahtinen, 2012).

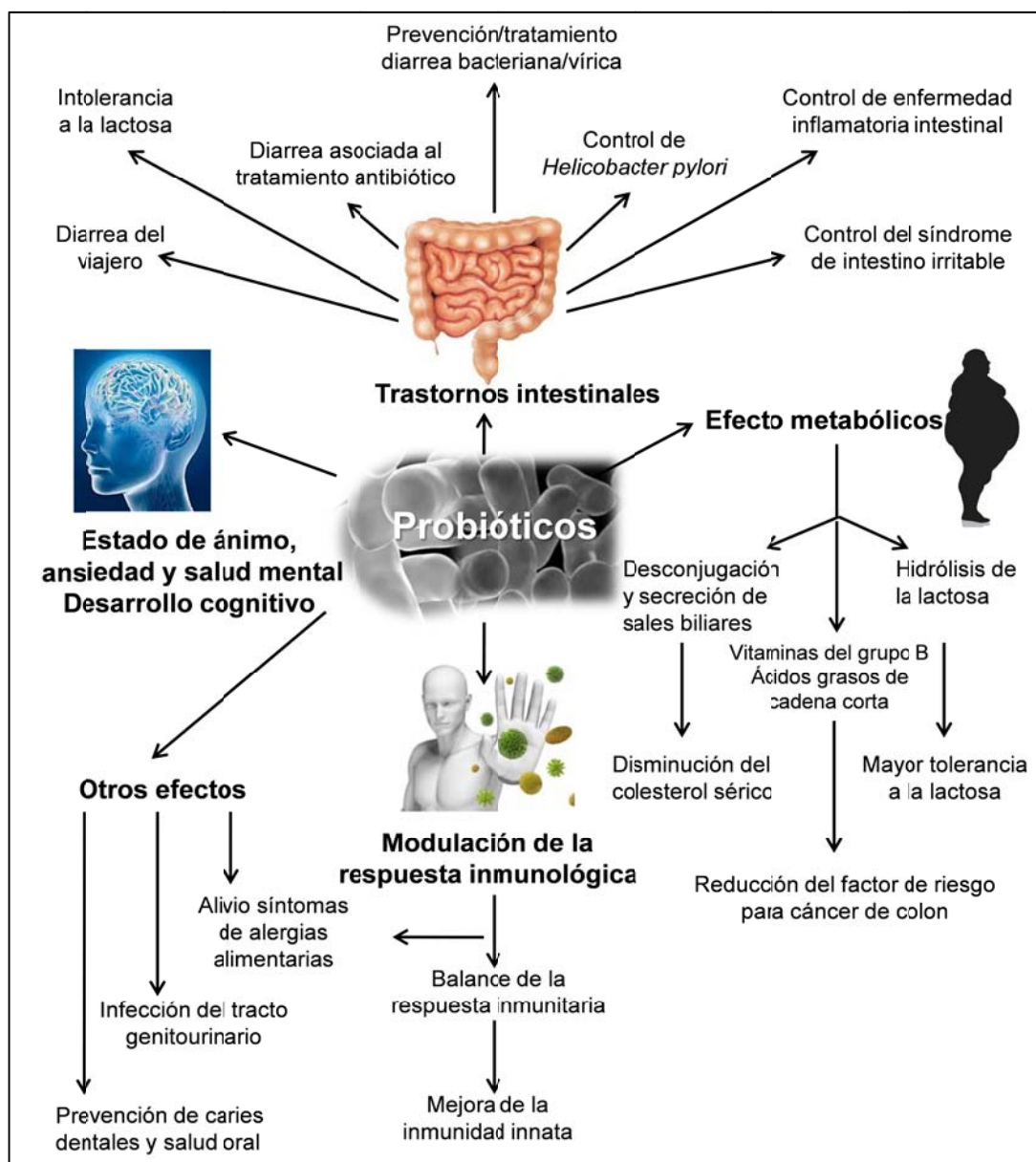


Figura 11. Beneficios para la salud proporcionados por los probióticos.

Fuente: Kailasapathy, 2013

II.2.4. Metabolismo de la lactosa

La lactosa, el principal glúcido presente en la leche (40-50 g/L), puede ser metabolizada por varias rutas, dependiendo de la bacteria y de las condiciones en las que se encuentre (Tabla 7). Las BAL tienen, al menos, dos sistemas de transporte activo de la lactosa al interior celular: un sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferasa (PEP-PTE, del inglés *phosphoenol pyruvate-dependent phosphotransferase*) y una permeasa específica. Los lactococos emplean el sistema PEP-PTE, que fosforila la

lactosa al mismo tiempo que la transporta; una vez en el interior, la fosfo- β -galactosidasa (EC 3.2.1.85) hidroliza la lactosa fosforilada en glucosa y galactosa-6-fosfato. Otras bacterias lácticas (*Str. thermophilus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*) poseen una permeasa que transporta la lactosa al interior de la célula sin modificarla; en el interior, la β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) hidroliza la lactosa a glucosa y galactosa.

Tabla 7. Metabolismo de la lactosa en las bacterias lácticas.

Género	Sistema de transporte	Ruta	Principales productos de la fermentación (moles/mol de lactosa)
<i>Lactococcus</i>	PEP-PTS	Homofermentativa	L-Lactato (4)
<i>Streptococcus</i>	Permeasa	Homofermentativa	L-Lactato (2 ó 4) ^a
<i>Lactobacillus</i>	Permeasa	Homofermentativa	D o DL-Lactato (2 ó 4) ^a
<i>Lactobacillus</i>	Permeasa	Heterofermentativa	D y/o L-Lactato ^b Etanol Acetato CO ₂ (2)
<i>Leuconostoc</i>	Permeasa	Heterofermentativa	D-Lactato (2) Etanol (2) CO ₂ (2)

^a Se generan dos moles de lactato si no se metaboliza la galactosa y cuatro si se metaboliza completamente.

^b La estequiometría de los productos de la fermentación en este caso depende de la especie y las condiciones de crecimiento. Fuente: Adaptado de Høier *et al.* (2010).

Hay dos rutas principales para metabolizar la glucosa, que además sirven para clasificar a las BAL (Tabla 7 y Figura 12) (Esteban y Pérez-Martínez, 2007). Las homofermentativas (*Lactococcus* sp., *Streptococcus* sp. y algunas especies del género *Lactobacillus* como *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus* y *L. salivarius*) utilizan la ruta glucolítica clásica o de Embden-Meyerhof-Parnas para metabolizar la glucosa. La enzima característica de esta ruta es la fructosa-1,6-bifosfato aldolasa, que desdobla la fructosa-1,6-bifosfato en dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído-3-fosfato (Tabla 8). A continuación, el gliceraldehído-3-fosfato se convierte en piruvato que se reduce finalmente a ácido láctico mediante la enzima lactato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺. En esta última transformación, el NADH formado en las primeras etapas se vuelve a oxidar, regenerándose el NAD⁺ para que la ruta siga operativa. Como producto final de esta ruta se obtiene casi exclusivamente ácido láctico (en teoría 2 moles de ácido láctico por mol de glucosa, aunque en la práctica el rendimiento suele oscilar entre 74 y 99%). La galactosa se fosforila y transforma en glucosa-6-fosfato (ruta de Leloir), mientras que la galactosa-6-fosfato, por la vía de la

tagatosa, acaba desdoblándose en las dos triosas fosfato anteriormente mencionadas (Figura 12).

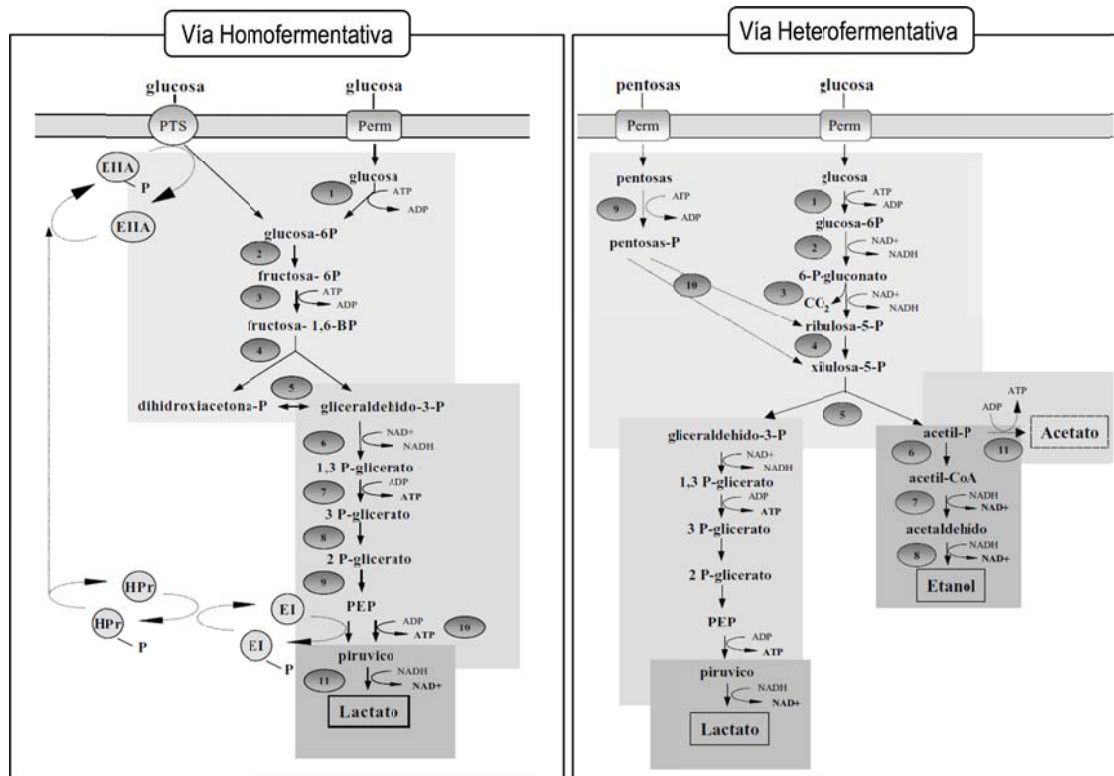


Figura 12. Rutas generales del catabolismo de la lactosa en BAL. Fuente: Esteban y Pérez-Martínez (2007).

Las BAL heterofermentativas (*Leuconostoc* sp. y otras especies del género *Lactobacillus* como *L. brevis*, *L. fermentum* y *L. reuteri*) carecen de la fructosa-1,6-bifosfato aldolasa y metabolizan la glucosa por medio de una serie distinta de reacciones: la ruta de las pentosas fosfato o de la fosfocetolasa, por ser ésta la enzima clave de la ruta (Figura 12 y Tabla 8). Por esta vía se generan CO₂, gliceraldehído-3-fosfato y acetil fosfato, hidrolizando la fosfocetolasa en la última parte la xilulosa-5-fosfato en gliceraldehído-3-fosfato y acetil fosfato. El gliceraldehído-3-fosfato sigue la ruta glicolítica de degradación, transformándose en ácido láctico, mientras que el acetil fosfato lo hace en ácido acético y/o etanol. Es decir, los productos finales de esta ruta son ácido láctico, CO₂, etanol y/o ácido acético, dependiendo la relación ácido acético/etanol del potencial de oxidoreducción del sistema (Tabla 7).

El rendimiento energético de la fermentación homoláctica es de 2 moles de ATP por mol de hexosa consumida. En condiciones de estrés (fuente de carbono limitante, pH muy ácido, temperatura muy baja) algunos microorganismos homofermentadores pueden producir ácido fórmico, ácido acético, acetaldehído y etanol. La ruta heterofermentativa tiene un rendimiento energético menor puesto que sólo rinde un mol de ATP por mol de glucosa metabolizada, excepto si el acetil fosfato formado

como intermediario se convierte a ácido acético en presencia de aceptores de electrones alternativos, en cuyo caso se obtiene un mol adicional de ATP (Figura 12) (Axelsson, 2004; Mayo *et al.*, 2010).

Tabla 8. Clasificación de especies del género *Lactobacillus* en función del metabolismo fermentativo.

Características	Grupo I Homofermentativas	Grupo II Heterofermentativas facultativas	Grupo III Heterofermentativas
Fermentación de pentosas:	—	+	—
Producción de CO ₂ a partir de:			
glucosa	—	—	+
gluconato	—	+ ^a	+ ^a
Presencia de:			
FDP aldolasa	+	+	—
fosfocetolasa	—	+ ^b	+
Especies representativas:			
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>
	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. buchneri</i>
	<i>L. helveticus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. fermentum</i>
	<i>L. salivarius</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. reuteri</i>

^a Fermentación

^b Inducible por pentosas

Fuente: Kandler y Weiss (1986).

Algunos lactobacilos son heterofermentativos facultativos porque metabolizan las hexosas por la ruta glucolítica generando ácido láctico pero, además, pueden degradar pentosas y gluconato por medio de una fofocetolasa inducible que pertenece a la ruta de las pentosas fosfato. El resultado es la formación de CO₂, ácido acético o etanol y ácido fórmico, además de ácido láctico, cuando la glucosa es limitante en el medio. Pertenecen a este grupo las especies *L. casei*, *L. plantarum* y *L. rhamnosus* (Tabla 8) (Axelsson, 2004; Mayo *et al.*, 2010). Algunas cepas de *Str. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* no tienen la capacidad de metabolizar la galactosa y la excretan al medio (Broome *et al.*, 2002).

Otro rasgo importante de la fermentación de azúcares es el tipo de isómero de ácido láctico producido, D(–) o L(+), que depende de la estereoespecificidad de la lactato deshidrogenasa (LDH): D-LDH o L-LDH (Tabla 7). Estas enzimas pertenecen a familias distintas y su actividad depende de NAD⁺. El tipo de isómero también depende de la presencia de una racemasa que cataliza la interconversión de los dos enantiómeros. Por lo tanto, el producto final de la fermentación puede ser ácido D(–)-o L(+)-láctico puros o a una mezcla racémica (DL). Algunas especies, como *L.*

delbrueckii subsp. *bulgaricus*, *L. jensenii* o *L. coryniformis*, sólo producen ácido D(–)-láctico; otras como *L. brevis*, *L. casei*, *L. rhamnosus* o *L. delbrueckii* subsp. *lactis* producen ácido L(+)-láctico; y, finalmente, otras como *L. helveticus*, *L. plantarum* o *L. pentosus*, producen una mezcla de ambos isómeros (Castillo-Martínez *et al.*, 2013). Tradicionalmente, se ha considerado que las bacterias productoras del isómero ácido D(–)-láctico podrían causar acidosis porque este isómero se metaboliza peor que el L(+)-láctico. Sin embargo, existen estudios clínicos que muestran que la administración a largo plazo de lactobacilos que producen ambos isómeros (en concreto, *L. reuteri* ATCC 55730) no tiene efectos negativos para la salud (Connolly *et al.*, 2005).

El tipo de isómero también es importante en algunos alimentos fermentados. Así, la formación de cristales de lactato cálcico en la superficie del queso se ha asociado a una mayor concentración del isómero D(–)-láctico, que es menos soluble que el L(+)-láctico (Johnson *et al.*, 1990). Por otro lado, el tipo de isómero tiene interés en las aplicaciones farmacéuticas y químicas de la fermentación láctica, como la producción de ácido poliláctico para la elaboración de plástico biodegradable (John *et al.*, 2007). Aunque el ácido láctico se puede obtener químicamente, el producido por fermentación tiene mayor pureza en cuanto a los isómeros ópticos obtenidos gracias a la especificidad anteriormente mencionada de la LDH.

II.2.5. Sistema proteolítico de las BAL

Las BAL tienen una capacidad limitada para sintetizar aminoácidos y deben proliferar y sobrevivir en la leche, un medio en el que la concentración de aminoácidos libres es muy baja. Por ello, necesitan un complejo sistema proteolítico para hidrolizar y utilizar los péptidos y proteínas presentes en la leche. Solo así pueden obtener los aminoácidos esenciales para multiplicarse y alcanzar una elevada densidad bacteriana. Aunque el papel biológico del sistema proteolítico sea satisfacer las necesidades nutritivas de la bacteria para su crecimiento, los péptidos y aminoácidos derivados de la hidrólisis proteica contribuyen además, positiva o negativamente, al sabor y aroma de los productos lácteos fermentados directamente o tras servir como precursores de otras moléculas (Johnson y Steele, 2013). Otra consecuencia importante de la proteólisis está relacionada con el valor nutritivo y funcional de los productos lácteos fermentados, ya que aumenta la biodisponibilidad de aminoácidos esenciales y algunos de los péptidos liberados tienen actividades biológicas que influyen en la salud del consumidor (Hayes *et al.*, 2007).

El sistema proteolítico de las BAL se compone de tres tipos de elementos: enzimas localizadas en el exterior de la célula, sistemas de transporte y enzimas intracelulares (Figura 13; Figura 14). Durante su crecimiento en leche las BAL utilizan el nitrógeno no proteico presente en el medio mediante sistemas de transporte especializados,

dependientes de energía, para aminoácidos y péptidos. Una vez agotada esa fuente, las caseínas (80% de las proteínas de la leche) son la principal reserva de nitrógeno pero deben ser hidrolizadas extracelularmente por una proteinasa extracelular unida a la pared celular. Esta proteinasa libera péptidos que pueden ser transportados al interior celular mediante sistemas de transporte más o menos específicos de oligo-, tri- y dipéptidos. Una vez en el medio intracelular, estos pequeños péptidos son completamente degradados a sus aminoácidos constituyentes por varias endo- y exopeptidasas intracelulares (Figura 13).

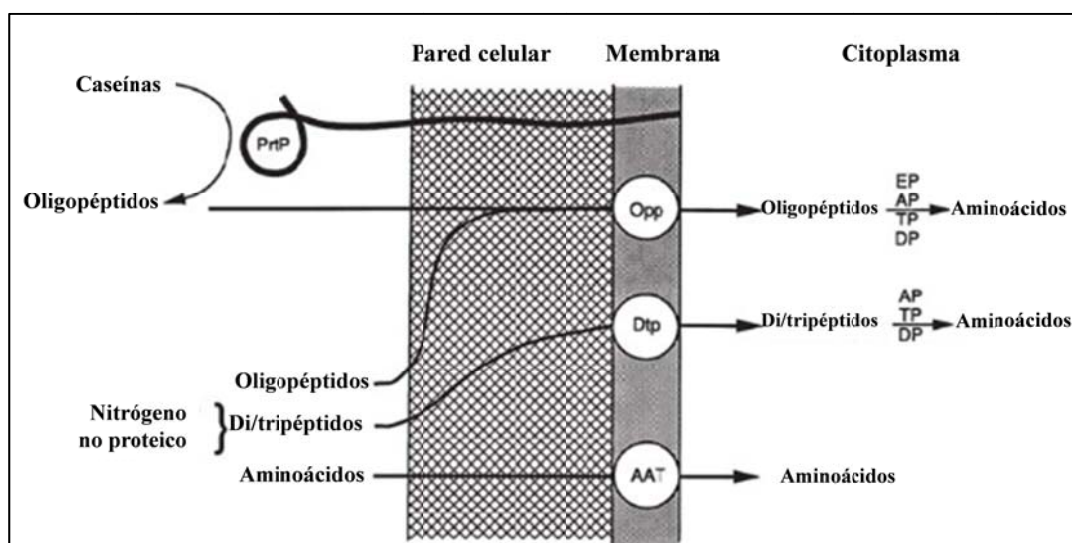


Figura 13. Representación esquemática del sistema proteolítico de las bacterias lácticas. PrtP, proteinasa asociada a la pared celular; Opp, sistema de transporte de oligopéptidos; Dtp, sistema de transporte de di-/tripéptidos, AAT, sistema de transporte de aminoácidos; EP, endopeptidasa; AP, aminopeptidasa, TP, tripeptidasa, DP, dipeptidasa. Fuente: Doyle y Buchanan, 2012.

Muchas BAL presentes en los cultivos iniciadores poseen una proteinasa ligada a la pared celular (PrtP), mientras que, en general, la microbiota secundaria carece de esta enzima y depende del cultivo iniciador para obtener los péptidos y aminoácidos necesarios para su crecimiento (Savijoki *et al.*, 2006). En comparación con otras BAL, los lactobacilos suelen poseer una gran diversidad de proteinasas y peptidasas y una gran redundancia en el número de genes que codifican di- y tri-peptidasas y endopeptidasas (Figura 14) (Liu *et al.*, 2011). El análisis genómico comparativo de 38 cepas de *L. helveticus* ha puesto de manifiesto la existencia de hasta cuatro proteinasas distintas en determinadas cepas, lo que explicaría su aptitud para la elaboración de queso. En relación con otras peptidasas, y con el metabolismo aminoacídico en general, también hay diferencias importantes entre las cepas estudiadas que se deben, no solo a que tengan distinta dotación génica, sino también a la presencia de mutaciones y polimorfismos que afectan al nivel de expresión de los genes

codificantes y/o la especificidad o actividad de las enzimas individuales (Broadbent *et al.*, 2011).

	<i>L. acidophilus</i> NCFM	<i>L. johnsonii</i> NCC533	<i>L. gasseri</i> ATCC3323	<i>L. bulgaricus</i> ATCC11842	<i>L. bulgaricus</i> ATCCBAA365	<i>L. helveticus</i> DPC4571	<i>L. plantarium</i> WCFS1	<i>L. brevis</i> ATCC367	<i>L. reuteri</i> F275	<i>L. sakei</i> 23K	<i>L. salivarius</i> UCC118	<i>L. casei</i> ATCC334	<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>P. pentosaceus</i> ATCC25745	<i>O. oeni</i> PSU1	<i>Leuc. mesenteroides</i> ATCC8293	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SK11	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	<i>Srr. thermophilus</i> CNRZ1 66	<i>Srr. thermophilus</i> LMG18311	<i>Srr. thermophilus</i> LMD9	
Proteinasa unida a la pared celular																							
PrtP*	1	1		1	1							2(1p)	2					1 ^b			1		
PrtM		1										1	1					1 ^b					
Transportadores de péptidos																							
Sistemas ABC de transporte de oligopéptidos																							
OppA	3	4	4	2	2	1						1	1			1	1	2 ^b	2	4	3		
OppB	1	1	1	1	1	1						1	1			1	1	2 ^b	2	1	1	1	
OppC	1	1	1	1	1(p)	1						1	1			1	1	2 ^b	2	1	1	1	
OppD	1	1	1	1	1	1						1	1			1	1	2 ^b	2	1	1	1	
OppF	1	1	1	1	1	1						1	1			1	1	2 ^b	1	1	1	1	
Sistema ABC de transporte de di/tripéptidos																							
DppA/P	3			6	5	1	4	3			1	1	3	2	2	3	2	3	3	2	1(p)	1(p)	1(p)
DppB	1			1	1	1	1	1			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1(p)	1(p)	1(p)
DppC	1			1	1	1	1	1			1	1	1	1	1	1	1	1	1	2(p)	2(p)	1(p)	
DppD	1			1	1	1	1	1			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1(p)	1(p)	1(p)	
DppF	1			1	1	1	1	1			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
DtpT	1	1	1								1	1	1	1			1	1	1	1	1	1	
Peptidasas																							
Aminopeptidasa																							
PepC	1	1(2) ^a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
PepN	1(1) ^a	1	1	1	1	1	1(1) ^a	1	1	1	1 ^b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
PepM	1	1	1	1	1	1	1	2			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
PepA	1	1	1	1	1	1						1				1	1	1	1	1	1	1	
Pep	1	1	1	1	1	1			1			1	1				1 ^b	1					
Endopeptidasa																							
PepE/PepG	3	3	3	2	2	3	1	1	1	1(p)		1	1		1								
PepO	2	3	3	1	1	3	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	2 ^b	2	1	1	1	
PepF	1	1	1	1	1	1	2	2			2	2	2	3	1	3	2	1	2 ^b	1	1	1	
Dipeptidasa																							
PepD	5(1p)	6	4	3(1p)	3(1p)	5(1p)	4	5	5	5	2	4	3	4	1		2	2(1p)	2	1(p)	1(p)	1(p)	
PepV	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1	

Figura 14. Sistema proteolítico en las bacterias lácticas, indicando el número de genes identificados en cada cepa mediante un código de color: color blanco, ausencia; color gris claro; gen único; y color gris oscuro: genes múltiples.

^aEntre paréntesis se indica el número de genes parálogos; p: pseudogen.

^bEl gen se encuentra en un plásmido.

*PrtP: serín proteinasa; PrtM: proteína de maduración de PrtP; OppA: proteína de unión del oligopéptido; OppB y OppC: permeasa; OppD y OppF: proteína de unión de ATP; DppA/P: proteína de unión de di/tri/oligopéptidos; DppB y DppC: permeasa; DppD y DppF: proteína de unión de ATP; DtpT: cotransportador de di/tripéptidos e iones. Fuente: Liu *et al.* (2011).

La proteinasa ligada a la pared celular es una serín proteasa y se expresa como un precursor. Cuando se transporta a través de la membrana citoplasmática, una peptidasa señal elimina el péptido señal del precursor inmaduro. Posteriormente, este precursor inmaduro se activa mediante la lipoproteína PrtM y la proteinasa activa queda anclada a la célula después de sufrir un cambio conformacional (Johnson y

Steele, 2011). La PrtP puede actuar sobre muchos sustratos, pero tiene una fuerte preferencia por las caseínas hidrofóbicas que, al tener muy poca estructura secundaria, son un sustrato muy accesible. Cuando la PrtP de los lactococos hidroliza la caseína β libera más de 100 péptidos distintos, con un tamaño de entre 4 y 30 aminoácidos, de los que casi una cuarta parte pueden ser transportados directamente por el sistema de transporte de oligopéptidos (Juillard *et al.*, 1995a y b). En los lactococos la PrtP puede estar codificada en un plásmido, que cuando se pierde limita sensiblemente la capacidad de la bacteria para multiplicarse en leche, o en el cromosoma bacteriano; en los lactobacilos, en cambio, los genes que codifican estas enzimas se localizan en el cromosoma bacteriano.

De los sistemas de transporte de los compuestos nitrogenados, el más importante, al menos en el género *Lactococcus* y para su crecimiento en leche, es el denominado Opp, un sistema de transporte de oligopéptidos de entre 4 y 18 residuos de aminoácidos (Juillard *et al.*, 1995b; Lanfermeijer *et al.*, 1999). El transportador Opp consta de una proteína de unión a péptidos responsable de la afinidad y especificidad (OppA), dos proteínas integrales de membrana (OppB y OppC) y dos proteínas que unen ATP (OppD y OppF). La proteína OppA tiene una gran influencia en el perfil peptídico y en la composición de compuestos volátiles en el queso y la modificación de su actividad puede contribuir al desarrollo de cultivos iniciadores mejorados (Picone *et al.*, 2005; Picone *et al.*, 2008). Aunque la información disponible sobre otros géneros es más escasa, es probable que el sistema Opp sea similar al descrito en lactococos (Figura 13). Otros transportadores de péptidos identificados en lactococos son el denominado Dpp, que transporta di-, tri- y tetrapéptidos conteniendo residuos relativamente hidrofóbicos y de cadena ramificada (aunque tiene mayor afinidad por los tripéptidos), y el denominado DtpT, que tiene preferencia por di- y tripéptidos conteniendo residuos más hidrofílicos y cargados (Savijoki *et al.*, 2006).

Probablemente el elemento más diverso del sistema proteolítico de las BAL sean las peptidasas intracelulares. Se han descrito varias endopeptidasas, aminopeptidasas, tripeptidasas y dipeptidasas con especificidad por diferentes tipos de péptidos (Figura 14 y Tabla 9). Su papel fisiológico se ha estudiado empleando mutantes deficientes en peptidasas específicas. Aunque ninguna de ellas parece ser esencial para la supervivencia de la bacteria en el laboratorio, su ausencia limita la velocidad de crecimiento de la bacteria en leche (Mierau *et al.*, 1996). Pero compitiendo con otras muchas bacterias en un ecosistema complejo, esta menor velocidad de crecimiento si puede influir de forma importante en su supervivencia a largo plazo (Christensen *et al.*, 1999). Las peptidasas también pueden ser una gran ventaja en productos fermentados de maduración prolongada, cuando tan solo queda una pequeña cantidad residual de lactosa. En estas condiciones, los péptidos y los aminoácidos que están presentes en grandes concentraciones pasan a ser la principal fuente nutritiva de las BAL que forman la microbiota secundaria. Las peptidasas de estas bacterias, junto con las posteriores transformaciones de los aminoácidos liberados, contribuyen de manera

significativa al sabor, aroma y textura de algunos productos como los quesos madurados (Awad *et al.*, 2007; Michaelidou *et al.*, 2003; Poveda *et al.*, 2004).

Tabla 9. Especificidad de las principales peptidasas de las bacterias lácticas.

Peptidasa	Abreviatura	Especificidad de sustrato
Aminopeptidasa N	PepN	$\text{NH}_2\text{-X}\downarrow\text{X}_n\text{-COOH}$
Aminopeptidasa C	PepC	$\text{NH}_2\text{-X}\downarrow\text{X}_n\text{-COOH}$
Aminopeptidasa S	PepS	$\text{NH}_2\text{-X}\downarrow\text{X}_n\text{-COOH}$
Aminopeptidasa A	PepA	$\text{NH}_2\text{-Glu/Asp}\downarrow\text{X}_n\text{-COOH}$
Aminopeptidasa L	PepL	$\text{NH}_2\text{-Glu/Asp}\downarrow\text{X}_n\text{-COOH}$
Tripeptidasa T	PepT	$\text{NH}_2\text{-X}\downarrow\text{X-X-COOH}$
Dipeptidasa D	PepD	$\text{NH}_2\text{-X}\downarrow\text{X-COOH}$
Dipeptidasa V	PepV	$\text{NH}_2\text{-X}\downarrow\text{X-COOH}$
Prolidasa Q	PepQ	$\text{NH}_2\text{-X}\downarrow\text{Pro-COOH}$
Prolidasa I	PepI	$\text{NH}_2\text{-Pro}\downarrow\text{X}_n\text{-COOH}$
Prolidasa R	PepR	$\text{NH}_2\text{-Pro}\downarrow\text{X-COOH}$

II.2.6. Formación de compuestos aromáticos y sápidos

Son muchos los compuestos y reacciones químicas y enzimáticas implicados en el desarrollo del sabor y aroma característico de los productos lácteos fermentados. Estos compuestos deben encontrarse, además, en proporciones muy precisas para que se perciba el sabor y aroma típico de un determinado producto; en caso contrario puede producirse una alteración organoléptica.

Del metabolismo de la lactosa, principal glúcido presente en la leche (40-50 g/L), se genera ácido láctico que contribuye al sabor ácido típico de los productos lácteos fermentados pero, al no ser volátil y no tener olor, no contribuye al aroma. También derivan del metabolismo de la lactosa los ácidos acético y fórmico, etanol, diacetilo, acetaldehído y CO_2 , dependiendo de la bacteria y las condiciones ambientales. El etanol tiene un umbral de percepción muy alto y probablemente no contribuya mucho al aroma y sabor de los productos lácteos, teniendo en cuenta la cantidad producida.

La leche también contiene una pequeña cantidad de ácido cítrico (1,5-2 g/L) que puede ser metabolizado por un reducido número de especies de BAL (del género *Leuconostoc*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* y algunos lactobacilos heterofermentativos facultativos) generando diacetilo, ácido acético y CO_2 . De todos ellos, el diacetilo tiene una gran importancia desde el punto de vista tecnológico puesto que es uno de los principales compuestos aromáticos en productos lácteos fermentados (Hugenholtz, 1993). El citrato es transportado al interior de la célula por una permeasa específica para el citrato y allí se transforma en piruvato (Figura 15). En condiciones

aeróbicas y en presencia de lactosa se genera mucho piruvato que se desvía a la formación de diacetilo (2,3-butanodiona), que puede ser reducido posteriormente a acetoína y 2,3-butanodiol (de menor intensidad aromática) una vez agotado el citrato del medio (García-Quintáns *et al.*, 2008). El transporte del citrato es una propiedad codificada en plásmidos tanto en los lactococos como en los leuconostocs (Smith *et al.*, 1992; Vaughan *et al.*, 1995).

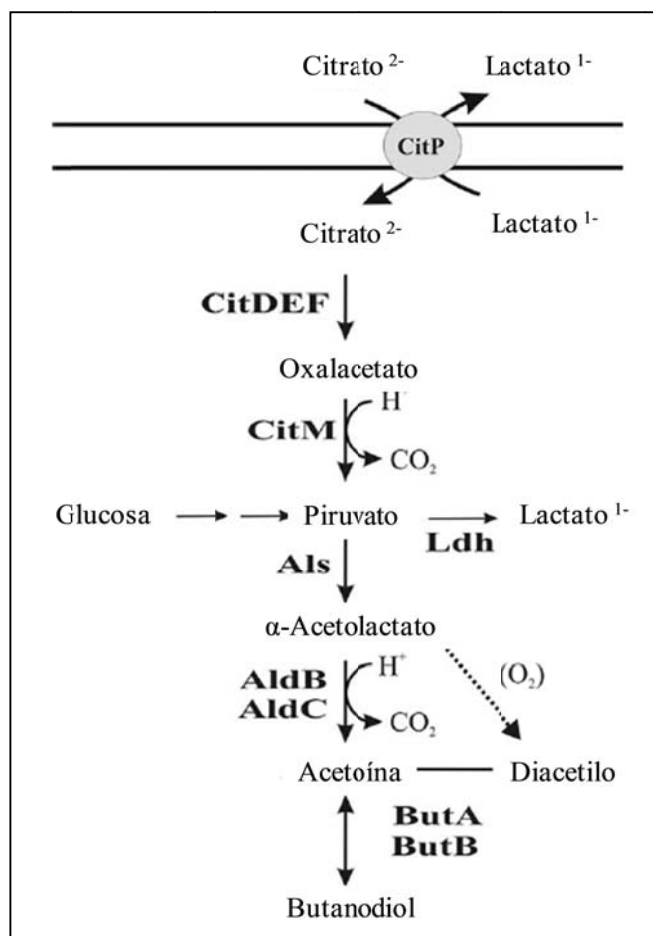


Figura 15. Ruta de formación del diacetilo y acetoína en BAL. CitP: transportador de citrato; CitDEF: complejo citrato liasa; CitM: oxalacetato descarboxilasa; Als: α-acetolactato sintetasa; Ldh: lactato deshidrogenasa; AldB y AldC: decarboxilasa de α-acetolactato; ButA y But B: 2,3-butanodiol deshidrogenasa.

Fuente: García-Quintáns *et al.* (2008)

La contribución de la proteólisis y del metabolismo de los aminoácidos al sabor y aroma de los productos lácteos es esencial, aunque los mecanismos implicados son muy complejos. A la acción de las enzimas de las BAL se suma la de las proteinasas de la leche y, en el caso del queso, otras enzimas presentes en el cuajo. Es importante que la degradación de las caseínas (generación e hidrólisis de péptidos) sea equilibrada para evitar la acumulación de péptidos amargos. Probablemente el amargor sea el

defecto más importante relacionado con la proteólisis en los productos lácteos fermentados. Se debe a la presencia de péptidos hidrofóbicos (3-27 residuos de aminoácidos, entre los que abunda la prolina) que se originan como consecuencia de la acción de las proteinasas de las BAL y el cuajo (en el caso del queso) sobre las caseínas. Estos péptidos amargos pueden degradarse a péptidos que no son amargos y aminoácidos gracias a la actividad de las peptidasas de las BAL (Johnson y Steele, 2011).

En el interior celular los aminoácidos se pueden convertir a sus correspondientes α -cetoácidos mediante aminotransferasas. Los α -cetoácidos se pueden considerar como intermediarios centrales a partir de los cuales se forman, enzimática (deshidrogenasas, descarboxilasas, aciltransferasas, liasas) o químicamente, numerosos derivados: aldehídos, alcoholes, ácidos carboxílicos y ésteres (de Cadiñanos *et al.*, 2013) (Figura 16). Los compuestos más potentes desde el punto de vista organoléptico derivan de lo

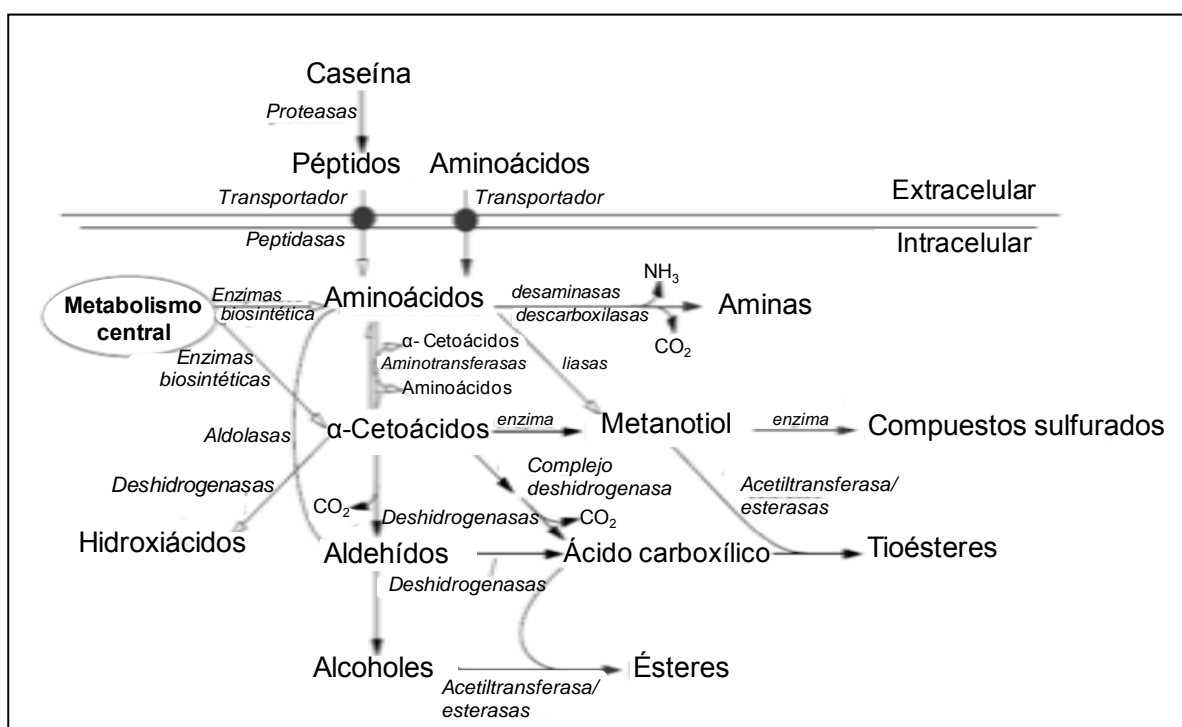


Figura 16. Vías de formación de compuestos aromáticos y sápidos en los productos lácteos fermentados a partir de las proteínas de la leche. Fuente: Van Kranenburg (2002).

aminoácidos metionina, fenilalanina, treonina y de los aminoácidos ramificados (Figura 16). Evidentemente el impacto en las características del producto final dependerá de la abundancia del aminoácido, la velocidad de conversión y el umbral de percepción del compuesto de él derivado (Fernández *et al.*, 2000; García-Cayuela *et al.*, 2012; Martínez-Cuesta *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2008; Smit *et al.*, 2005).

La grasa de la leche es otro componente esencial para el desarrollo de un correcto aroma en los productos lácteos fermentados (Figura 17). Por un lado, la hidrólisis de los triacilglicéridos de la leche (lipólisis) es el origen de ácidos grasos, entre los que destacan los de cadena corta que tienen un aroma y sabor particularmente intenso y característico. Además, estos ácidos grasos pueden ser transformados en productos como cetonas, lactonas, ésteres, alcoholes secundarios y aldehídos con peculiares y potentes características sápidas y olfativas. Por otro lado, la grasa actúa como un disolvente para multitud de compuestos aromáticos (deseables o no) derivados no sólo a partir de la grasa, sino también de la degradación de proteínas y lactosa. La rancidez oxidativa de la grasa láctea es una transformación química que tiene gran repercusión en el sabor de los productos lácteos fermentados porque

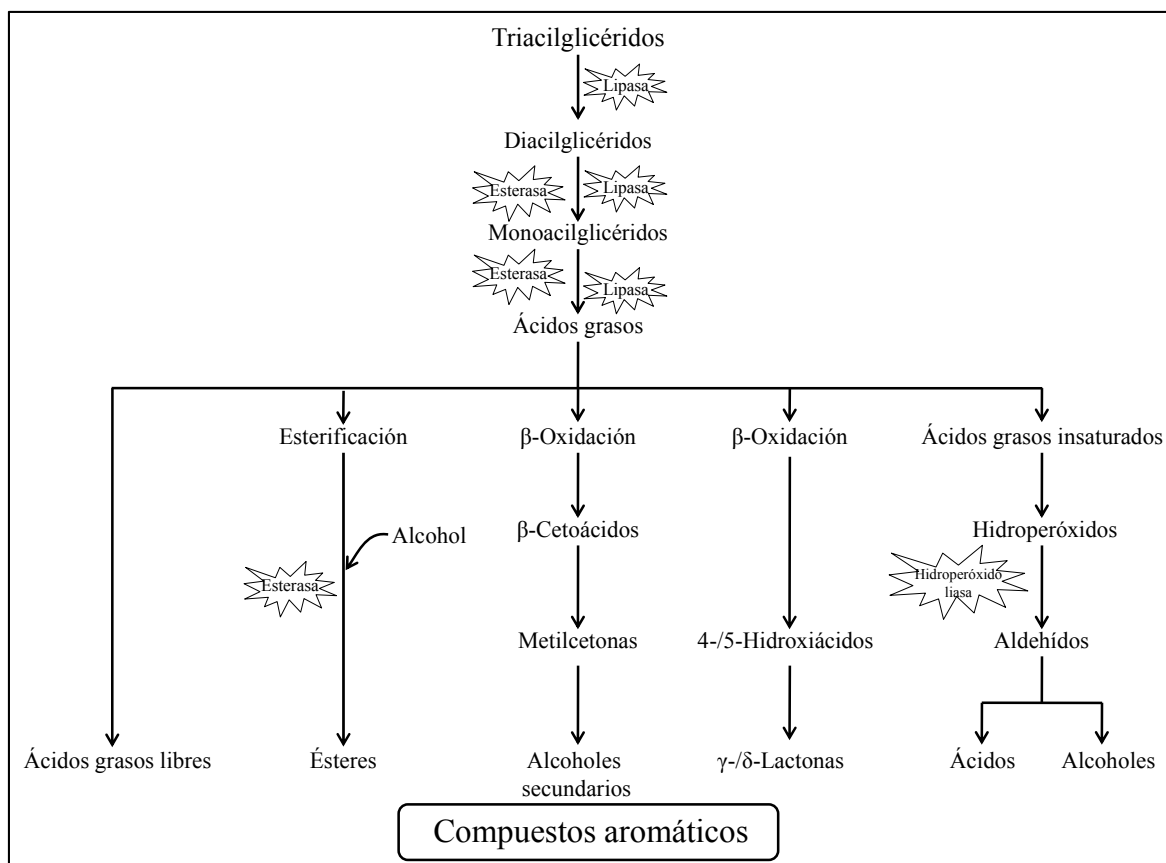


Figura 17. Formación de compuestos aromáticos a partir de la grasa de la leche.
Fuente: McSweeney *et al.* (2000).

determina la aparición de numerosos aldehídos insaturados que tienen un intenso y desagradable olor. El bajo potencial redox de algunos productos lácteos fermentados como el queso, debido en parte a las BAL, limita la intensidad de estas reacciones (El-Hofi *et al.*, 2011).

La lipólisis se debe a la acción de lipasas y esterases y es esencial para el sabor y aroma de productos lácteos fermentados con periodos prolongados de maduración. Las lipasas actúan sobre triacilglicéridos que se encuentren en la interfase lípido-agua de una emulsión y liberan ácidos grasos de cadena larga, mientras que las esterases lo hacen en ésteres solubles y liberan ácidos grasos de cadena corta (Jaeger *et al.*, 1994). Aunque se ha descrito la existencia de enzimas lipolíticas en las BAL, siempre han recibido mucha menos atención que las enzimas proteolíticas. Esto quizá sea consecuencia de su menor contribución a la lipólisis de los productos lácteos fermentados. La lipasa nativa de la leche, la presente en el cuajo, la producida por mohos o la añadida intencionadamente en algunas ocasiones tienen un efecto mucho más marcado (McSweeney y Sosa, 2000). Sin embargo, las esterases y lipasas de las bacterias del cultivo iniciador o adjunto o de la microbiota secundaria contribuyen notablemente a la liberación de ácidos grasos en aquellos productos en los que estas bacterias se encuentran en número elevado y durante largos periodos de tiempo (Abeijón Mukdsi *et al.*, 2009; Crow *et al.*, 2001). Las lipasas/esterases de las BAL son más activas sobre acilglicéridos con ácidos grasos de cadena corta, prefiriendo los mono- y diacilglicéridos sobre los triacilglicéridos; es decir, su mejor sustrato es una grasa parcialmente hidrolizada. Las esterases de las BAL también intervienen en la síntesis de ésteres de ácidos grasos de cadena corta cuando la a_w del queso disminuye durante la maduración (Holland *et al.*, 2005) (Tabla 10).

II.2.7. Control de otros microorganismos

La fermentación láctica contribuye a controlar la presencia de microorganismos indeseables en el producto final. Los mecanismos de antagonismo microbiano de las BAL son muy variados e incluyen la competencia por nutrientes, la disminución del pH como resultado de la producción de ácidos orgánicos (ácidos láctico, acético, fórmico, fenilacético) y la producción de otras sustancias con actividad antimicrobiana como etanol, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, diacetilo, ácidos grasos de cadena corta, bacteriocinas, reuterina y/o reuteriicina (Leroy y De Vuyst, 2004). De hecho, las BAL y/o sus metabolitos son alternativas muy atractivas como bioconservantes, incluso en alimentos no fermentados, en el marco actual de la creciente demanda por parte de los consumidores de alimentos frescos, menos procesados y sin aditivos químicos, pero seguros (Reis *et al.*, 2012; Robertson *et al.*, 2013).

De todos los compuestos con actividad antimicrobiana producidos por las BAL, las bacteriocinas se encuentran entre los más atractivos y estudiados. Las bacteriocinas se definen como péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal que tienen un amplio espectro inhibitorio que abarca tanto a microorganismos patógenos como a alterantes (El-Ghaish *et al.*, 2011). La actividad antibacteriana de las bacteriocinas se

Tabla 10. Principales ésteres encontrados en productos lácteos fermentados.

Éster	Aroma	Umbral (ppm)	Cantidad (ppm)	Leche/Queso
Acetato de etilo	Disolvente	5 (ac [*])	52–99	Queso de oveja
	Afrutado	22 (lip)	0,05–0,25	Parmesano
	Piña			
Butirato de etilo	Manzana	0,005 (ac)	0,026–0,152	Batido de fruta
	Plátano	0,0035–0,028 (lip)	0,146	Queso de cabra
	Dulce	0,6 (lip)	0,28–1,82	Cheddar
	Afrutado	0,00013–0,45 (ac)	0,026–0,05	Emmental
			0,124–0,362	Grana Padano
			0,25–1,14	Parmesano
Caproato de etilo	Plátano	0,005 (ac)	0,20–0,268	Batido de fruta
	Piña	0,2	9–14	Queso de oveja
	Dulce	0,02–0,04 (lip)	0,258	Queso de cabra
	Afrutado		0,43–2,08	Cheddar
	Vino	0,001 (ac)	0,062–0,142	Emmental
	Brandy	0.9 (lip)	0,05	Mozzarella
			1,23	Danés azul
			0,215–0,993	Grana Padano
			2,58	Parmesano
Caprilato de etilo	Pera	0,9	0,9–5	Queso de oveja
	Dulce		0,48	Queso de cabra
	Afrutado	0,0001 (ac)	0,28–1,07	Cheddar
	Plátano		0,6	Mozzarella
	Piña		0,1–0,13	Gorgonzola
	Albaricoque		0,037–0,229	Grana Padano
	Vino		0,25–1,62	Parmesano
	Floral			
Caprato de etilo	Manzana	1,5	1,4–5	Queso de oveja
	Brandy		0,901	Queso de cabra
	Uva	0,2 (10% etanol)	0,002–0,02	Gorgonzola
	Afrutado	0,05	0,05	Mozzarella
	Aceitoso		0,002–0,03	Grana Padano
			0,25–1,0	Parmesano
			11,48	Danés azul
2-Feniletil-acetato	Floral	0,137 (lip)	0,083	Queso de cabra
	Rosa	0,02 (ac)	0,02	Mozzarella
	Miel		0,0005–1,0	Camembert

*ac: medio acuoso; lip: medio lipídico

Fuente: Liu *et al.* (2004).

considera una estrategia muy útil para que la bacteria productora mantenga su población y reduzca el número de competidores; de esta forma podrá obtener más nutrientes y espacio para su multiplicación (Yang *et al.*, 2014)

Las bacteriocinas producidas por las BAL se consideran péptidos seguros ya que no son activos ni tóxicos para las células eucariotas y, por su naturaleza proteica, son digeridas por las proteasas presentes en el tracto digestivo humano, inactivándose sin formar compuestos secundarios que pudieran ocasionar un daño a la salud. Pero no hay mucha información sobre el posible desarrollo de resistencia a las bacteriocinas (Montville y Chikindas, 2013).

La capacidad de producir bacteriocinas es bastante habitual entre los microorganismos implicados en las fermentaciones (Tabla 11). Esta propiedad también es muy beneficiosa para los que se utilizan como probióticos. La clasificación de las bacteriocinas ha sido objeto de numerosos estudios ya que este término agrupa sustancias con distinta estructura química, determinantes genéticos y espectro de acción bactericida. Una de las clasificaciones más utilizadas se basa en sus características bioquímicas y organización genética y las agrupa en tres clases (Tabla 11) (Gálvez *et al.*, 2007; Ness *et al.*, 1996).

Los lantibióticos (bacteriocinas de clase I) son pequeños péptidos que contienen residuos que han sufrido una modificación postranscripcional gracias a la cual pueden formar enlaces covalentes internos, lo que les confiere mayor resistencia a la hidrólisis; la nisina es el principal representante de esta clase (Gálvez *et al.*, 2007). Las bacteriocinas de la clase II son las más frecuentes y se caracterizan por ser moléculas pequeñas (<10 kDa) que no contienen aminoácidos modificados y se dividen, a su vez, en cuatro subclases (Tabla 11); entre ellas se encuentra la pediocina PA-1, que se caracteriza por tener una gran actividad frente a *Listeria* (Rodríguez *et al.*, 2002). En la clase III se incluyen moléculas de gran tamaño que son sensibles al calor; se ha propuesto que se denominen “bacteriolisinas” dado que, más que péptidos, son proteínas líticas (Pérez *et al.*, 2014).

II.2.8. Aminas biógenas

Una ruta de conversión de los aminoácidos que ha sido estudiada con bastante detalle por su implicación en la calidad y seguridad de los productos lácteos fermentados es la desaminación y descarboxilación de los aminoácidos a amina biógenas (Figura 18). Las aminas biógenas son compuestos nitrogenados orgánicos básicos que tienen actividad biológica, siendo su principal vía de formación la descarboxilación de aminoácidos. Están presentes en muchos alimentos, pero los productos fermentados, y en concreto los lácteos, pueden acumular concentraciones superiores a 1 g/kg de producto. Su importancia se debe a que la ingesta de grandes cantidades de aminas puede causar problemas toxicológicos graves, especialmente en

Tabla 11. Clasificación de bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas.

Clase	Características	Ejemplos	Bacteria productora
I	Lantibióticos Péptidos pequeños (< 5 Kda) activos a nivel de la membrana Contienen lantionina, β-metil-lantionina y aminoácidos deshidratados	Nisina A Nisina Q Nisina U Nisina Z Lacticina 3147 Plantaricina W Enterocina W	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Lc. lactis</i> <i>Lc. lactis</i> <i>L. plantarum</i> <i>E. faecalis</i>
II	Bacteriocinas no modificadas Péptidos pequeños (< 10 Kda) Termoestables		
IIa	Bacteriocinas de la familia de la pediocina Activas frente a <i>Listeria</i> Secuencia consenso TGNGVXC* en la región N-terminal	Pediocina PA-1 Carnobacteriocina X Enterocina NKR-5-3C Enterocina A Munditicina Leucocina A Plantaricina S Lactococina G Lactacin F Salivaricina P Lactococina Q Enterocina NKR-5-3AZ Enterocina X Carnociclina A	<i>P. acidilactici</i> <i>L. plantarum</i> <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> <i>E. faecium</i> <i>E. faecium</i> <i>E. mundtii</i> <i>Leuconostoc gelidum</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. salivarius</i> <i>Lc. lactis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. faecium</i> <i>Carnobacterium maltaromaticum</i>
IIb	Bacteriocinas de dos componentes Formadas por dos péptidos diferentes, ambos necesarios para una mayor actividad antimicrobiana	Enterocina AS-48 Gassericina A Lactociclina Q Leucociclina Q	<i>E. faecalis</i> <i>L. gasseri</i> <i>Lactococcus</i> sp. <i>Leuc. mesenteroides</i>
IIc	Bacteriocinas cíclicas Estructura circular como resultado de la unión entre los grupos N- y C- terminal mediante enlace covalente	Lactococina A	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lc. lactis</i> <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
IId	Otras bacteriocinas de clase II Péptidos lineales Incluye bacteriocinas sec-dependientes y sin péptido señal	Lactococina A Lacticina Q Leucocina Q Leucocina N	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lc. lactis</i> <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
III	Bacteriolisinas Péptidos grandes (> 30 kDa) Sensibles a tratamiento térmico	Caseicina 80 Enterolisina A Enterocina MMT05 Helveticina J	<i>L. casei</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. faecalis</i> <i>L. helveticus</i>

*TGNGVXC: Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys.

Adaptado de: Perez *et al.* (2014); Yang *et al.* (2014).

individuos sensibles. Por eso, existe gran interés en reducir su presencia en productos lácteos. Una posibilidad es emplear cepas de BAL que no posean los genes necesarios para llevar a cabo esa transformación (Linares *et al.*, 2011; Linares *et al.*, 2012).

También se puede reducir la población de BAL con actividad descarboxilasa y/o las descarboxilasas mediante el empleo de nuevos tratamientos de conservación como por ejemplo, altas presiones (Calzada *et al.*, 2012)

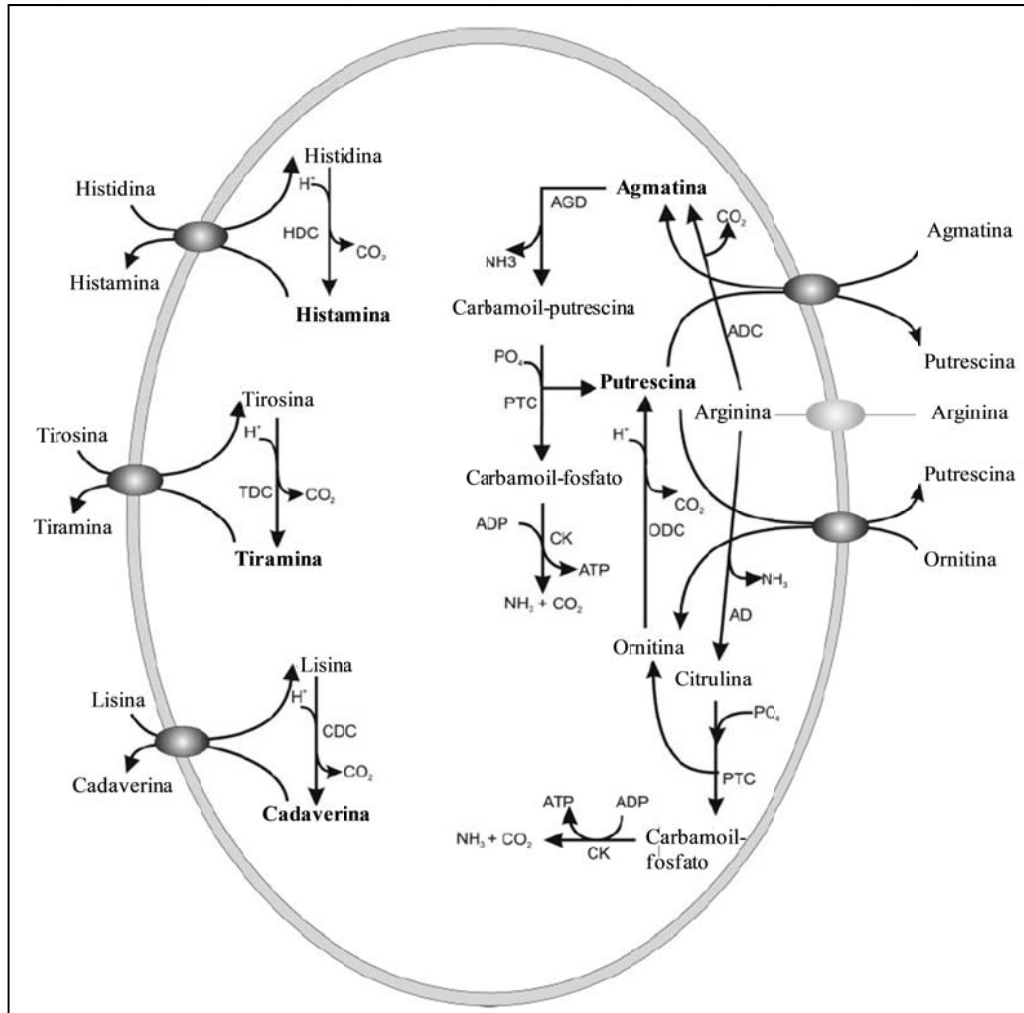


Figura 18. Rutas de formación de aminas biógenas en las bacterias lácticas. ADC, arginina descarboxilasa; AGD, agmatina deiminasa; AD, arginina deiminasa; HDC, histidina descarboxilasa, LDC, lisina descarboxilasas; TDC, tirocina descarboxilasas; ODC, ornitina descarboxilasa, CK, carbamato quinasa; y PTC, putrescina carbamoil transferasa. Fuente: Linares *et al.* (2011).

II.2.9. Preparación industrial de los cultivos iniciadores

Tradicionalmente existen dos alternativas para añadir las bacterias empleadas como inóculo (cultivo iniciador, adjunto o probiótico) a los tanques o cubas de fermentación. La primera consiste en propagar secuencialmente el cultivo en la fábrica

a partir de una preparación comercial liofilizada o congelada hasta obtener un volumen de cultivo activo con la concentración apropiada para adicionarlo al tanque de fermentación. La propagación en la fábrica se hace en leche entera o desnatada, leche en polvo reconstituida o medios elaborados a base de suero con suplementos (como extracto de levadura) para potenciar el crecimiento. El cultivo comercial se propaga inicialmente en el laboratorio de la fábrica en un medio esterilizado para obtener un pequeño volumen de un cultivo madre. A partir de éste se prepara un cultivo intermedio con un mayor volumen que permitirá elaborar el fermento que se empleará en la fase de producción. Aunque históricamente la producción de estos cultivos iniciadores líquidos se hacía en la propia fábrica, este proceder requiere tener personal cualificado e instalaciones adecuadas donde se mantengan condiciones de esterilidad para evitar la contaminación con otras cepas y bacteriófagos. Por ello, su uso ha quedado relegado a la producción artesanal o a países en vías de desarrollo (Harris, 1998).

Para evitar los costes económicos (equipo, personal, producción) y problemas asociados a la propagación del cultivo en la fábrica, es mucho más frecuente utilizar los cultivos de adición directa o DVI (del inglés, *direct-to vat inoculation*). Se trata de preparaciones que contienen una elevada concentración de bacterias (más de 10^{10} y 10^{11} ufc/g en el caso de los congelados y liofilizados, respectivamente). De hecho, existen grandes empresas dedicadas a la comercialización de este tipo de cultivos microbianos concentrados que ofrecen una gama amplia de cultivos iniciadores, adjuntos y probióticos. Los procedimientos para su producción se asemejan a los estándares utilizados en la industria farmacéutica.

La producción comercial de estos cultivos microbianos requiere generar una gran cantidad de biomasa (Figura 19). Se emplean medios de cultivo estériles elaborados a partir de componentes lácteos y varios suplementos (extracto de levadura, vitaminas y minerales) en grandes tanques (2.000 a 40.000 L). Durante el crecimiento de las bacterias, la producción de ácido láctico suele llegar a ser autolimitante, por lo que es imprescindible controlar el pH (6.0-6.3 para los cultivos mesófilos y 5.5-6.0 para los termófilos) para lograr una mayor biomasa bacteriana. Tanto la composición exacta del medio de cultivo como las variables de proceso (temperatura, velocidad de agitación, gases, etc.) deben adaptarse para cada cepa. Una vez obtenida la biomasa, las células se recuperan mediante centrifugación o filtración con membranas (microfiltración o ultrafiltración). Estos concentrados pueden congelarse en masa (envasados en lata) o en forma de pellets; en cualquier caso, la congelación debe ser rápida por lo que se emplea nitrógeno líquido. Una alternativa a la congelación es liofilizar los concentrados, en cuyo caso se debe añadir algún crioprotector antes de la congelación para mejorar la tasa de supervivencia de las bacterias. El envasado de los concentrados bacterianos congelados o liofilizados se hace empleando un gas inerte y materiales opacos a la luz e impermeables al oxígeno y la humedad.

En general, la actividad de estos cultivos se mantiene hasta 12 y 24 meses para las preparaciones congeladas y liofilizadas, respectivamente (Høier *et al.*, 2010). Las preparaciones liofilizadas son las más demandadas ya que ocupan un menor volumen, pueden conservarse en algunos casos a temperatura ambiente, aunque su vida útil se alarga si se conservan en refrigeración o congelación (-18 °C), y, además, tienen una elevada supervivencia y una rápida reactivación cuando se añaden a la leche.

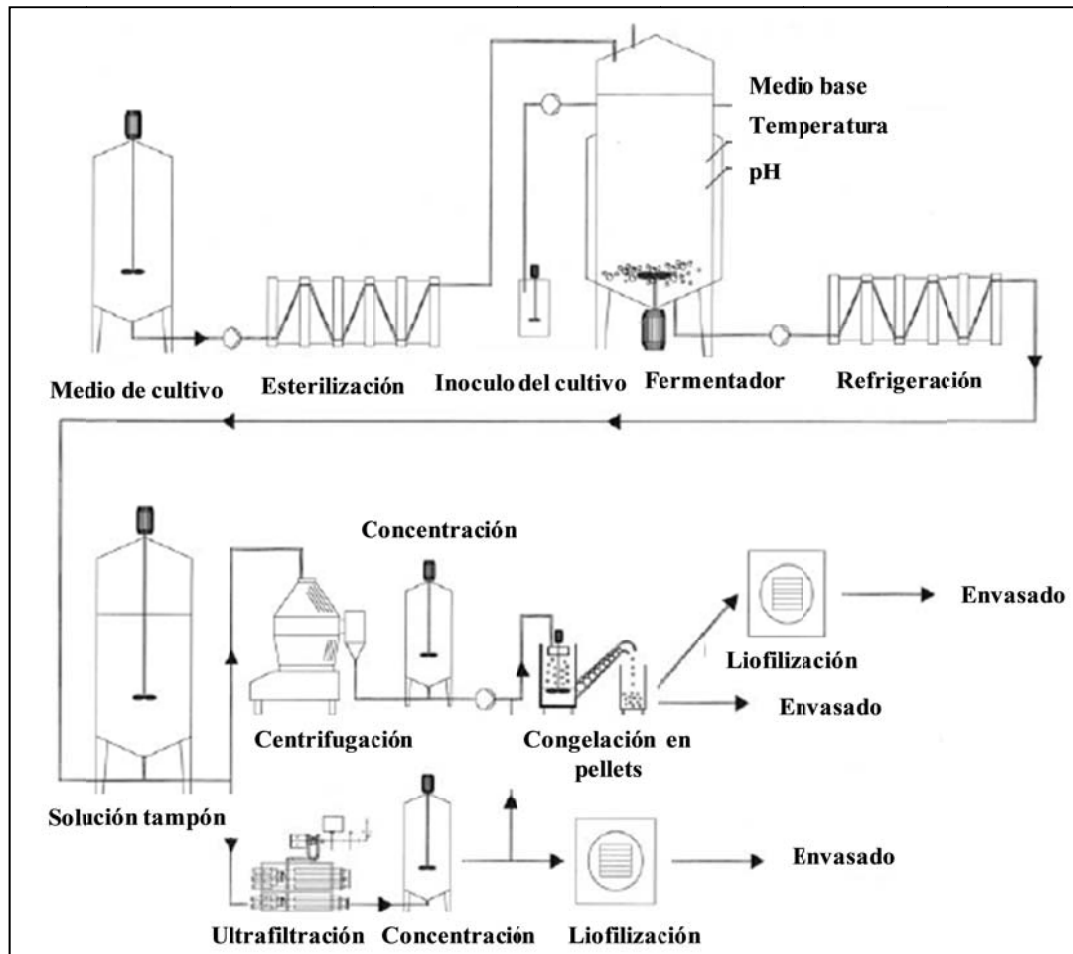


Figura 19. Esquema típico de producción de cultivos microbianos para la industria láctea. Fuente: Høier *et al.* (2010).

Las condiciones empleadas en todas estas operaciones pueden modificar la viabilidad de las células, como por ejemplo la presencia de oxígeno, el pH, la presión durante la centrifugación o la filtración y el daño a la membrana durante la congelación y/o secado (Champagne, 2006).

En algunas especies, al menos de lactococos y lactobacilos, el crecimiento se puede hacer en condiciones aeróbicas y en presencia de grupo hemo (y metaquinona, en algunos casos). De esta forma, la bacteria tiene un metabolismo respiratorio que

permite obtener una mayor cantidad de biomasa, un pH final menos ácido y una mayor supervivencia a largo plazo (Lechardeur *et al.*, 2010). Otra alternativa propuesta para mejorar la productividad de estos cultivos microbianos es la fermentación en continuo. Esta opción puede ser problemática, especialmente en el caso de los probióticos, por la susceptibilidad a la contaminación y la alteración de características de la bacteria críticas para su funcionalidad (Soccol *et al.*, 2010).

Los probióticos, en contraste con el cultivo iniciador, no suelen multiplicarse activamente durante la elaboración del producto fermentado. Y si lo hacen, requieren unas condiciones (en especial, la temperatura) diferentes a las apropiadas para el cultivo iniciador. La práctica más habitual en las leches fermentadas es añadir la concentración final deseada de probiótico en el producto mezclándolo con el cultivo iniciador, siendo este último el encargado de desarrollar las características organolépticas apropiadas. Este es el caso, por ejemplo, de los cultivos ABT, que contienen *L. acidophilus*, una cepa de *Bifidobacterium* y *Str. thermophilus*, para la elaboración de leche fermentada probiótica (Saarela *et al.*, 2000). En cualquier caso, es importante que el probiótico no perturbe las características organolépticas del producto y que mantenga la viabilidad a lo largo de todas las etapas tecnológicas y durante el almacenamiento del producto fermentado. La microencapsulación de los probióticos se ha postulado como una alternativa eficiente para proteger el probiótico durante la elaboración industrial del producto fermentado en el que va vehiculado así como durante su tránsito a través del tracto gastrointestinal (Forssten *et al.*, 2011; Solanki *et al.*, 2013).

En los últimos años, los consumidores han comenzado a reclamar productos que además de cubrir sus necesidades nutritivas tengan un beneficio adicional para la salud, contengan menos aditivos, tengan un menor procesamiento y posean características organolépticas novedosas. Por ello, hay una gran demanda de nuevos cultivos con mejor funcionalidad que permitan elaborar productos con una calidad y características organolépticas diferenciadas. Sin duda, el foco de atención está en la búsqueda de probióticos, teniendo siempre en cuenta que esos efectos no pueden ser extrapolados de una cepa a otra ni siquiera dentro de la misma especie. Precisamente el uso de cultivos DVI puede ser una gran ventaja porque permite mezclar varias cepas producidas individualmente para obtener nuevas e interesantes relaciones sinérgicas (Casarotti *et al.*, 2014; Smid *et al.*, 2014).

II.3. LA LECHE HUMANA COMO FUENTE DE PROBIÓTICOS

La leche materna está considerada como la mejor opción para la nutrición del niño durante los primeros meses de vida porque le aporta los nutrientes más adecuados para su óptimo desarrollo y crecimiento. Además, cumple otras funciones distintas de la nutrición como conferir una cierta protección frente a enfermedades intestinales, educar al inmaduro sistema inmunológico infantil y estrechar el vínculo emocional entre la madre y el niño (Kennell y McGrath, 2005; Morrow *et al.*, 2004; Newburg, 2005). Todos estos efectos probablemente sean debidos a la acción sinérgica de los distintos componentes con actividad biológica de la leche materna entre los que cabe destacar oligosacáridos, inmunoglobulinas, lisozima, lactoferrina y otras muchas proteínas, hormonas, péptidos con actividad antimicrobiana, ácidos grasos, poliaminas, células inmunocompetentes y bacterias (Ballard y Morrow, 2013; Fernández *et al.*, 2013).

II.3.1. Composición bacteriológica de la leche humana

El paradigma de la esterilidad de la leche humana ha sido ciegamente aceptado hasta hace muy poco tiempo, incluso entre la comunidad científica, a pesar de haber sido objeto de muy escaso estudio. Pero en las últimas décadas se ha demostrado que esa concepción dista mucho de la realidad ya que la leche materna, al igual que otros fluidos biológicos, contiene una microbiota diversa y compleja (Tabla 12) (Beasley y Saris, 2004; Heikkilä y Saris, 2003; Hunt *et al.*, 2011; Jiménez *et al.*, 2008a; Jost *et al.*, 2013; Martín *et al.*, 2003; Martín *et al.*, 2004; Marín *et al.*, 2009). La existencia de una microbiota específica no es una característica exclusiva de la leche humana sino que es un rasgo común en la leche de los mamíferos (Quigley *et al.*, 2015; Martín *et al.*, 2009; Martín *et al.*, 2010).

El estudio microbiológico de la leche humana en condiciones fisiológicas se inició hace algo más de una década empleando las técnicas disponibles en aquel momento, las técnicas clásicas de cultivo. Los primeros estudios mostraron que los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Enterococcus* eran comunes en las muestras analizadas, independientemente de su procedencia geográfica (Heikkilä y Saris, 2003; Martín *et al.*, 2003) (Figura 20). Otros estudios realizados poco tiempo después confirmaron estos resultados y permitieron aislar otros géneros de bacterias Gram-positivas (*Leuconostoc*, *Actinomyces*, *Gemella*, *Rothia*...) y Gram-negativas (*Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*) que se encuentran con menor frecuencia y en menor abundancia, aunque su presencia suele asociarse al uso de sacaleches (Jiménez *et al.*, 2008a; Jiménez *et al.*, 2008b).

Tabla 12. Diversidad bacteriana de la leche humana.

Filo	Género	Técnicas dependientes de cultivo	Técnicas independientes de cultivo
Actinobacteria	<i>Actinomyces</i>	<i>A. odontolyticus</i> <i>A. naeslundii</i>	<i>Actinomyces</i>
	<i>Arthrobacter</i>		<i>A. cummingsii</i>
	<i>Brachybacterium</i>	<i>Brachybacterium</i> spp.	
	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. adolescentis</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. breve</i> <i>B. longum</i> <i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>B. adolescentis</i> <i>B. animalis</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. breve</i> <i>B. catenolatum</i> <i>B. infantis</i> <i>B. longum</i> <i>B. longum</i> <i>B. pseudocatenulatum</i>
	<i>Collinsella</i>		<i>Collinsella</i>
	<i>Corynebacterium</i>	<i>Corynebacterium</i> spp.	<i>C. aurimucosum</i> <i>C. coyleae</i> <i>C. pseudogenitalium</i> <i>K. kristinae</i> <i>K. rhizophila</i>
	<i>Kocuria</i>	<i>K. rhizophila</i> <i>K. palustris</i> <i>K. rhizophila</i>	
	<i>Microbacterium</i>	<i>M. maritpicum</i>	<i>Microbacterium</i>
	<i>Micrococcus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>M. luteus</i>
	<i>Paenibacillus</i>		<i>P. amylolyticus</i>
	<i>Parascovia</i>	<i>P. denticolens</i>	
	<i>Propionibacterium</i>	<i>P. acnes</i> <i>P. granulosum</i>	<i>P. acnes</i> <i>P. granulosum</i>
	<i>Rhodococcus</i>		<i>Rhodococcus</i>
	<i>Rothia</i>	<i>R. mucilaginosa</i> <i>R. amarae</i> <i>R. dentocariosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>
Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i>		<i>Bacteroides</i>
	<i>Flavobacterium</i>		<i>Flavobacterium</i>
			<i>Pedobacter</i> <i>Prevotella</i>
	<i>Pedobacter</i>		
	<i>Prevotella</i>		
Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. vietnamiensis</i> <i>B. pumilus</i>
	<i>Blautia</i>		<i>Blautia</i>
	<i>Carnobacterium</i>		<i>Carnobacterium</i>
	<i>Clostridium</i>		<i>C. leptum</i> <i>C. coccoides</i>

Tabla 12. Diversidad bacteriana de la leche humana (cont.).

Filo	Género	Técnicas dependientes de cultivo	Técnicas independientes de cultivo
Firmicutes	<i>Coprococcus</i>		<i>Coprococcus</i>
	<i>Dorea</i>		<i>Dorea</i>
	<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
		<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
		<i>E. durans</i>	
		<i>E. hirae</i>	
		<i>E. mundtii</i>	
		<i>E. gallinarum</i>	
	<i>Faecalibacterium</i>		<i>Faecalibacterium</i>
	<i>Gemella</i>	<i>G. haemolysans</i>	<i>G. haemolysans</i>
	<i>Granulicatella</i>	<i>Gra. adiacens</i>	<i>Granulicatella</i>
	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. gasseri</i>
		<i>L. gasseri</i>	<i>L. fermentum</i>
		<i>L. fermentum</i>	<i>L. rhamnosus</i>
		<i>L. crispatus</i>	<i>L. gastricus</i>
		<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. plantarum</i>
		<i>L. salivarius</i>	<i>L. lactarius</i>
		<i>L. reuteri</i>	<i>L. reuteri</i>
		<i>L. plantarum</i>	<i>L. rhamnosus</i>
		<i>L. gastricus</i>	<i>L. salivarius</i>
		<i>L. vaginalis</i>	<i>L. vaginalis</i>
		<i>L. casei</i>	
		<i>L. animalis</i>	
		<i>L. brevis</i>	
		<i>L. helveticus</i>	
		<i>L. oris</i>	
	<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lc. lactis</i>
	<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i>	<i>Leuc. citreum</i>
		<i>Leuc. citreum</i>	<i>Leuc. fallax</i>
			<i>Leuc. mesenteroides</i>
	<i>Lysinibacillus</i>		<i>Lysinibacillus</i>
	<i>Pediococcus</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>P. pentosaceus</i>
	<i>Peptostreptococcus</i>		
	<i>Roseburia</i>		<i>Roseburia</i>
	<i>Ruminococcus</i>		<i>Ruminococcus</i>
	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
		<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
		<i>S. capitis</i>	<i>S. hominis</i>
		<i>S. hominis</i>	<i>S. xylosus</i>
		<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>
		<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. lugdunensis</i>
		<i>S. pasteurii</i>	
		<i>S. warneri</i>	

Tabla 12. Diversidad bacteriana de la leche humana (cont.).

Filo	Género	Técnicas dependientes de cultivo	Técnicas independientes de cultivo
Firmicutes	<i>Streptococcus</i>	<i>Str. oris</i>	<i>Str. parasanguis</i>
		<i>Str. parasanguis</i>	<i>Str. bovis</i>
		<i>Str. australis</i>	<i>Str. oralis</i>
		<i>Str. gallolyticus</i>	<i>Str. salivarius</i>
		<i>Str. vestibularis</i>	<i>Str. infantis</i>
		<i>Str. lactarius</i>	<i>Str. peroris</i>
		<i>Str. agalactiae</i>	
		<i>Str. peroris</i>	
		<i>Str. cristatus</i>	
		<i>Str. oralis</i>	
		<i>Str. sanguinis</i>	
	<i>Subdoligranulum</i>		<i>Subdoligranulum</i>
	<i>Veillonella</i>	<i>V. atypica</i>	<i>Veillonella</i>
		<i>V. dispar</i>	
		<i>V. parvula</i>	
	<i>Weissella</i>		<i>W. confusa</i>
			<i>W. cibaria</i>
Proteobacteria	<i>Bradyrhizobium</i>		<i>Bradyrhizobium</i>
	<i>Brevundimonas</i>		<i>Brevundimonas</i>
	<i>Mesorhizobium</i>		<i>Mesorhizobium</i>
	<i>Novosphingobium</i>		<i>Novosphingobium</i>
	<i>Ochrobactrum</i>		<i>Ochrobactrum</i>
	<i>Sphingomonas</i>		<i>Shingomonas</i>
	<i>Sphingobium</i>		<i>Sphingobium</i>
	<i>Sphingopyxis</i>		<i>Sphingopyxis</i>
	<i>Burkholderia</i>		<i>B. multivorans</i>
	<i>Neisseria</i>		<i>N. elongata</i>
	<i>Ralstonia</i>		<i>Ralstonia</i>
	<i>Acinetobacter</i>		<i>A. johnsonii</i>
			<i>A. calcoaceticus</i>
	<i>Citrobacter</i>		<i>C. freundii</i>
	<i>Dyella</i>		<i>Dyella</i>
	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>
	<i>Klebsiella</i>		<i>K. milletis</i>
			<i>K. oxytoca</i>
			<i>K. pneumoniae</i>
	<i>Kluyvera</i>		<i>K. cryocrescens</i>
	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>
		<i>P. oleovorans</i>	<i>P. pseudoalcaligenes</i>
			<i>P. synxantha</i>
	<i>Serratia</i>		<i>S. proteomaculans</i>
	<i>Stenotrophomonas</i>		<i>Stenotrophomonas</i>
Verrucomicrobia	<i>Akkermansia</i>		<i>A. muciniphila</i>

Fuentes: Jeurink *et al.* (2013), Jost *et al.* (2013), Marín *et al.* (2009).

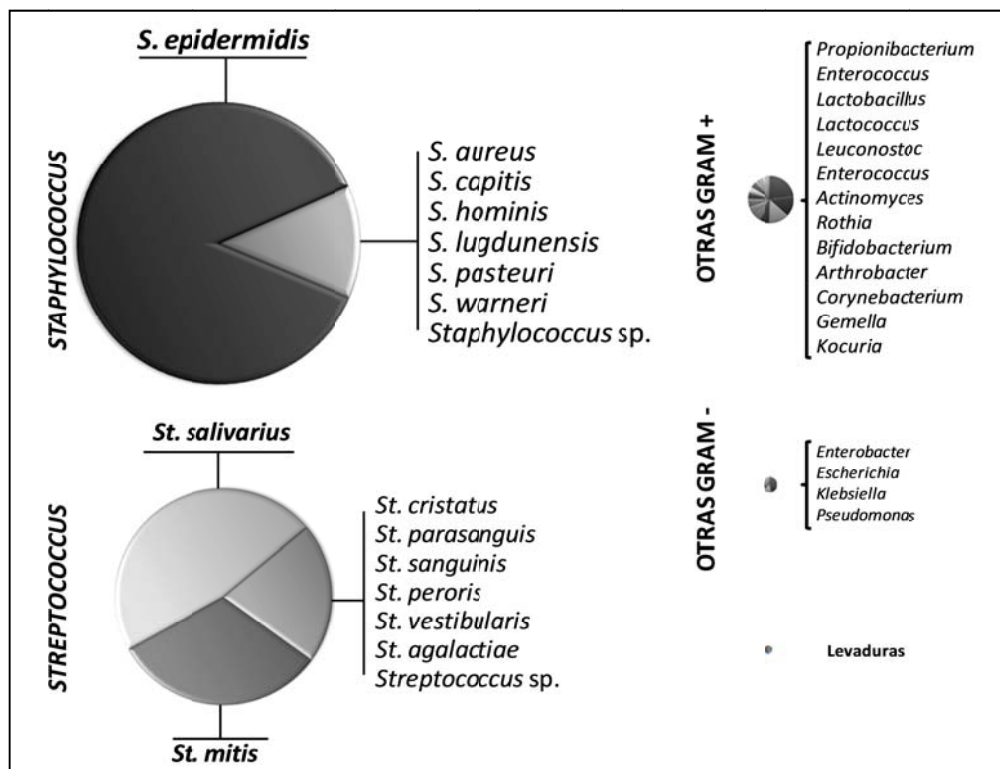


Figura 20. Especies cultivables más frecuentes presentes en la microbiota de la leche humana. Fuente: Beltrán *et al.* (2015).

Utilizando los medios y condiciones apropiados también es posible aislar bacterias anaerobias estrictas pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* y *Veillonella* (Martín *et al.*, 2009; Marín *et al.*, 2009; Grönlund *et al.*, 2007; Jost *et al.*, 2013; Soto *et al.*, 2014). Si se tiene en cuenta que, del total de las bacterias presentes en comunidades bacterianas complejas, sólo se puede cultivar un pequeño porcentaje, se deduce que con estas técnicas sólo se puede estudiar una pequeña fracción de la diversidad microbiana presente en la leche humana. Se estima que con las técnicas disponibles actualmente sólo se puede cultivar el 30% de los microorganismos presentes en la microbiota intestinal, mucho más compleja que la de la leche humana.

Los resultados obtenidos aplicando métodos moleculares para el estudio de la microbiota de la leche materna muestran que es mucho más compleja y diversa. Estos métodos, que abarcan desde la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización a las actuales técnicas de secuenciación masiva, han confirmado la presencia en muestras de leche humana de DNA de todos los géneros y especies aislados con las técnicas de cultivo (Martín *et al.*, 2009; Cabrera-Rubio *et al.*, 2012; Soto *et al.*, 2014). También han corroborado que los géneros mayoritarios presentes en la leche humana son *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* y, en menor medida, *Propionibacterium*, pero la mayor sensibilidad de estas técnicas permite apreciar la gran diversidad de filotipos presentes en este fluido biológico (Hunt *et al.*, 2011; Jost

et al., 2013). A pesar de la diversidad observada, a veces incluso en las muestras tomadas de una misma mujer, parece existir un número relativamente pequeño de unidades taxonómicas operacionales en todas las muestras analizadas (47 muestras obtenidas de 16 mujeres), aunque en cantidad variable: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Ralstonia*, *Propionibacterium*, *Sphingomonas* y *Bradyrhizobiaceae* (Hunt *et al.*, 2011) (Figura 21).

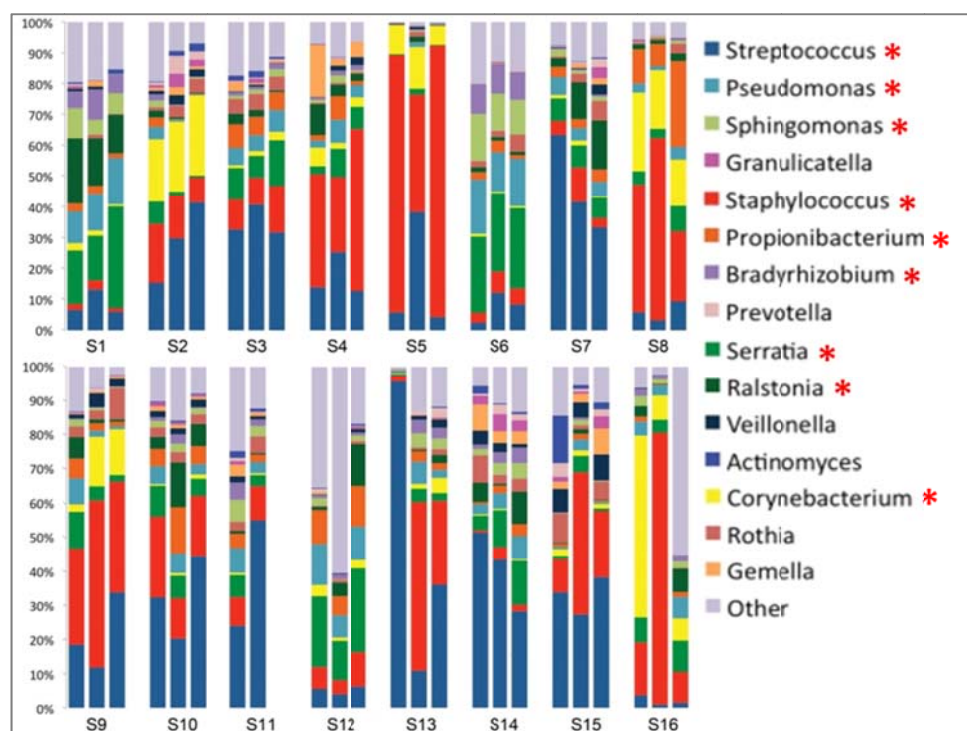


Figura 21. Diversidad bacteriana en leche materna analizada con técnicas de secuenciación masiva. Se muestran los 15 géneros bacterianos más abundantes en cada una de las 3 muestras de leche obtenidas de 16 mujeres en distintos momentos de la lactancia. Los géneros marcados con un asterisco rojo se corresponden con las 9 unidades taxonómicas operacionales presentes en todas las muestras analizadas. Fuente: Hunt *et al.* (2011).

Debe señalarse que recientemente se ha descrito la existencia de un posible factor de confusión en el estudio de comunidades microbianas mediante técnicas independientes de cultivo en muestras que contienen una baja densidad de biomasa bacteriana, como ocurre con la leche humana. Se trata de la presencia habitual de DNA contaminante, procedente sobre todo de bacterias Gram-negativas, en los kits de extracción de DNA y en otros reactivos de laboratorio que puede dar lugar a resultados erróneos; para evitarlo, en este tipo de muestras, es esencial realizar los controles negativos pertinentes (Salter *et al.*, 2014).

En otro estudio sobre la diversidad microbiana en leche, en el que participaron siete mujeres que donaron muestras en tres momentos distintos, empleando pirosecuenciación se detectó la presencia de una pequeña cantidad de DNA de *Bifidobacterium* y *Veillonella*; y en un pequeño porcentaje de muestras pudieron incluso aislarse bacterias viables pertenecientes a esos géneros. Además, también se aisló DNA de otras bacterias anaerobias estrictas como *Bacteroides* y varios miembros de la clase Clostridia: *Blautia*, *Dorea* y *Ruminococcus* y varios productores de butirato como *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Coprococcus* y *Subdoligranulum* (Jost *et al.*, 2013). Estas bacterias, que son muy difíciles de aislar por su sensibilidad al oxígeno, se encuentran habitualmente en el intestino humano y tienen una estrecha relación con la salud intestinal. A la hora de interpretar los resultados obtenidos cuando se emplean estas técnicas independientes de cultivo debe tenerse en cuenta que también pueden introducir un sesgo en los resultados obtenidos. Además, de la ya mencionada presencia de DNA contaminante en los reactivos empleados, no todas las especies bacterianas tienen la misma respuesta a los protocolos de lisis para el aislamiento y la amplificación del DNA, como ya se ha descrito hace algún tiempo (Reysenbach *et al.*, 1992). Por otro lado, estas técnicas no permiten distinguir si los microorganismos están vivos o no.

La composición de la microbiota de la leche materna puede variar en respuesta a distintos factores como el tipo de parto (vaginal o cesárea), la edad gestacional, el uso de antibióticos, la alimentación, el estado de salud materna, el tiempo de lactancia y la obesidad (Cabrera-Rubio *et al.*, 2012; Hunt *et al.*, 2011; Soto *et al.*, 2014). De todos ellos cabe destacar la repercusión de la antibioterapia. En un estudio reciente se ha observado que la frecuencia de detección de lactobacilos y bifidobacterias en leche materna se reduce alrededor de un 50% cuando las mujeres reciben antibióticos durante el embarazo y la lactancia (Soto *et al.*, 2014). Es posible que las variaciones en la composición de la leche, en concreto el tipo y abundancia de oligosacáridos o de ácidos grasos, influyan en la diversidad y composición de esta microbiota (Hunt *et al.*, 2012; Musilova *et al.*, 2014).

II.3.2. Origen de las bacterias presentes en la leche humana

Uno de los temas más interesantes en relación con las bacterias presentes en la leche materna es su origen. Lo más habitual es pensar que proceden de la microbiota presente en la piel del pecho. El recién nacido se coloniza con la microbiota vaginal y rectal de la madre durante el parto y posiblemente transfiere parte de los microorganismos a la piel del pecho de la madre durante el amamantamiento; las bacterias presentes en la piel del pecho podrían “contaminar” la leche durante la eyección e, incluso, colonizar la glándula mamaria lactante (Figura 22). El hecho de que los géneros mayoritarios en la leche sean *Staphylococcus*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium* (géneros también habituales en la piel) ha contribuido a que esta idea se haya mantenido vigente durante mucho tiempo (Rosenthal *et al.*, 2011).

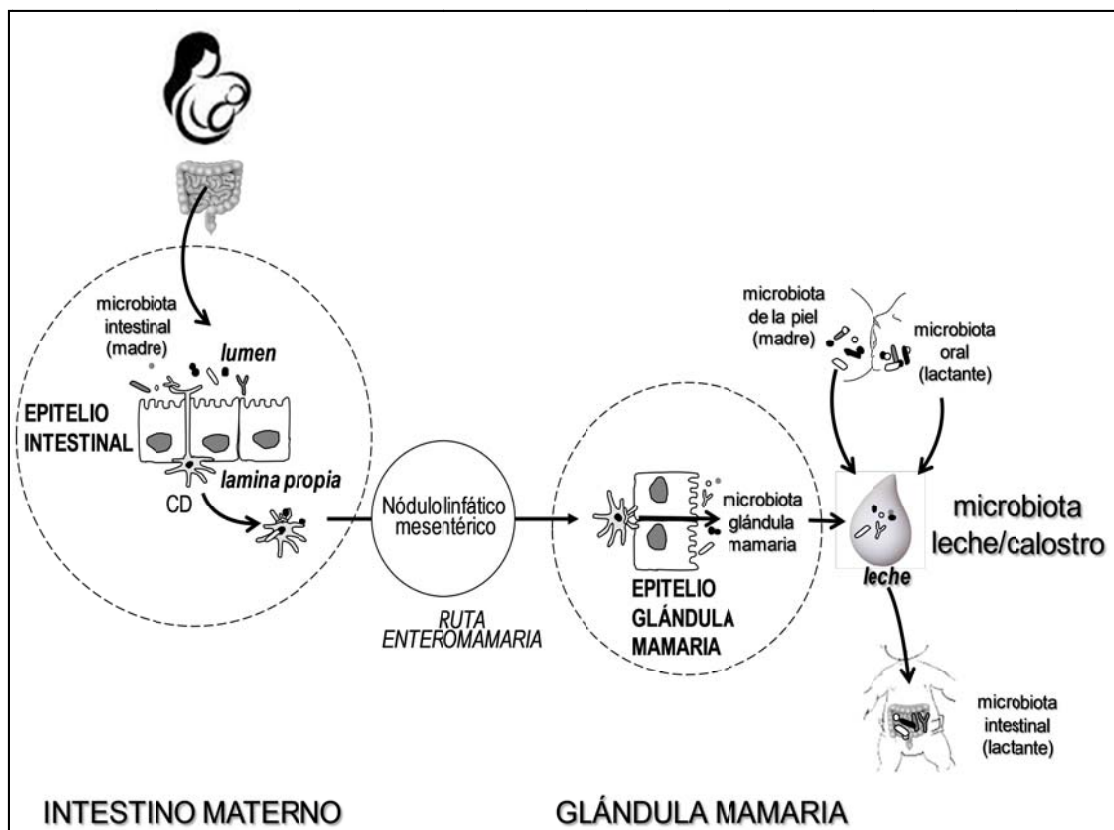


Figura 22. Posibles rutas para el establecimiento de la microbiota de la leche humana. Los cambios fisiológicos durante el embarazo y la lactancia favorecen la migración de bacterias hacia la glándula mamaria con la ayuda de las células del sistema inmunitario para el establecimiento y desarrollo de la microbiota de la glándula mamaria. Además, los miembros de la microbiota de la piel de la madre así como la de la cavidad oral del lactante pueden contribuir a la formación de la microbiota de la leche.

Por otra parte, se ha descrito que durante la toma se produce un cierto flujo retrógrado de la leche que se encuentra en la boca del niño hacia los conductos de la glándula mamaria, promoviendo el intercambio de bacterias (Ramsay *et al.*, 2004). El género *Streptococcus* es, precisamente, uno de los más abundantes en la cavidad oral del lactante (Zaura *et al.*, 2014; Hunt *et al.*, 2011; Jiménez *et al.*, 2008a y b). Aunque no se puede descartar que ésta sea una vía de acceso para las bacterias, es probable que haya otra ruta ya que se pueden aislar bacterias del calostro obtenido antes de que se inicie la lactancia e incluso de pre-calostro obtenido antes del nacimiento del niño (Jiménez *et al.*, 2008a).

Pero, sin lugar a dudas, el hecho de poder aislar de la leche humana bacterias pertenecientes a géneros que se caracterizan por su estricto carácter anaerobio y por su estrecha asociación con el intestino (*Bifidobacterium*, *Veillonella*) es un claro indicio de la existencia de una ruta alternativa y que ésta debe ser, muy probablemente, de origen endógeno: es la denominada ruta enteromamaria (Rodríguez, 2014) (Figura 22).

Varios autores han demostrado que las bacterias que colonizan el intestino neonatal proceden del intestino materno, relegando la importancia de la microbiota vaginal materna en este proceso (Makino *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2007a; Matsumiya *et al.*, 2002). Esta ruta endógena está relacionada con la presencia de células dendríticas en la lámina propia del intestino y su capacidad de emitir dendritas que pueden atravesar el epitelio intestinal, sin comprometer su integridad, e interaccionar con las bacterias que se encuentran en el lumen intestinal (Rescigno *et al.*, 2001). Las células dendríticas activadas pueden transportar las bacterias a través de la circulación sanguínea hasta la glándula mamaria, siendo secretadas en la leche (Martín *et al.*, 2004; Perez *et al.*, 2007). De hecho, hay una mayor tasa de translocación bacteriana en el intestino durante el embarazo y la lactancia y una mayor presencia de monocitos conteniendo bacterias en la sangre periférica y en el tejido de la glándula mamaria durante el final del embarazo y la lactancia (Donnet-Hughes *et al.*, 2010).

II.3.3. Funciones de la microbiota de la leche materna

Independientemente de la ruta utilizada, la leche materna se caracteriza por tener una microbiota variada y propia, siendo una de sus principales funciones la colonización del intestino del recién nacido. La transmisión microbiana de la madre a la descendencia, lejos de ser una anomalía, se trata de un fenómeno universal en el reino animal. En los mamíferos esta transmisión se iniciaría durante la gestación. La placenta y el útero, considerados hasta hace poco estériles para mantener al feto libre de infecciones, también tienen su microbiota propia; es decir, la colonización del feto se inicia en el útero a través de la placenta (Jiménez *et al.*, 2005; Aagaard *et al.*, 2014).

La colonización continuaría durante el nacimiento y la lactancia a través de la leche materna. Un lactante que ingiera unos 800 mL de leche diarios recibirá con ella entre 10^5 y 10^7 bacterias al día (Martín *et al.*, 2004). De esta forma, se asegura una correcta colonización microbiana de la descendencia y, en consecuencia, el progenitor dirige y controla la transmisión de una vasta cantidad de información genética asociada al microbioma. En este sentido, diversos estudios han confirmado que la leche materna y las heces del lactante de cada par madre-hijo lactante comparten las mismas cepas de bacterias pertenecientes a los géneros *Staphylococcus*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Esto indica que la leche materna contribuye a la transferencia de bacterias desde la madre a su hijo lactante y, por lo tanto, a la colonización intestinal del niño (Martin *et al.*, 2012). De hecho el tipo de alimentación que recibe el niño (leche materna o de fórmula) tiene una gran influencia en la microbiota intestinal del niño. En las heces de los lactantes alimentados con leche materna hay un claro predominio de *Staphylococcus epidermidis*, la bacteria cultivable más abundante en la leche materna (Jiménez *et al.*, 2008).

La colonización del intestino es clave por todas las funciones que desempeña la microbiota intestinal del lactante: contribuye a protegerle de infecciones, programa su

sistema inmunitario innato, participa en la digestión de nutrientes, proporciona distintas sustancias bioactivas y potencia un adecuado desarrollo cognitivo (Sommer y Bäckhed, 2013). Esta microbiota, al modular el desarrollo inicial de la respuesta inmunitaria, también puede ayudar a prevenir en etapas posteriores de la vida enfermedades como el asma, las enfermedades inflamatorias intestinales o la diabetes de tipo 1 (Walker e Iyengar, 2015). Por otra parte, algunas cepas de *B. breve* aisladas de leche humana tienen la capacidad de sintetizar lípidos bioactivos como los ácidos linoleico y linolénico conjugados (Villar-Tajadura *et al.*, 2014). Por todo ello, la leche materna se puede considerar como nuestro primer probiótico (Martín *et al.*, 2003; McGuire y McGuire, 2015).

En los últimos años se está poniendo de manifiesto la importancia de las primeras interacciones entre la microbiota y el hospedador en la salud a corto y largo plazo (Bergmann *et al.*, 2014). Además, la microbiota mamaria también podría ser importante para la madre a largo plazo (Bergmann *et al.*, 2014). Recientemente se ha sugerido que existe una estrecha relación entre una disbiosis en el tejido mamario y el cáncer de mama (Xuan *et al.*, 2014). En definitiva, toda la evidencia disponible apoya la conveniencia de promover la lactancia materna exclusiva con una duración adecuada para obtener el máximo beneficio para la pareja madre-lactante.

II.3.4. Propiedades probióticas de las bacterias aisladas de la leche humana

Ya desde los primeros trabajos en los que se investigó la presencia de bacterias en la leche materna, se sugirió que su presencia en ese fluido obedecía a su posible papel como probióticos en el intestino infantil (Martín *et al.*, 2003; Martín *et al.*, 2004). La evaluación *in vitro* de cuatro cepas de lactobacilos aislados de leche materna (*L. gasseri* CECT 5714, *L. gasseri* CECT 5715, *L. fermentum* CECT 5716 y *L. salivarius* CECT 5713) que incluía el estudio de la supervivencia durante su paso por el tracto gastrointestinal, la producción de compuestos antimicrobianos, la adherencia a células intestinales, la producción de aminas biógenas, la degradación de mucinas, el perfil enzimático y el perfil de resistencia a antimicrobianos, reveló que su potencial probiótico era igual o mejor que el de otras cepas empleadas habitualmente como probióticos en la industria alimentaria (*L. rhamnosus* GG, *L. johnsonii* La1 y *L. casei* imunitass (Martín *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2006; Olivares *et al.*, 2006). En concreto, estas cepas de lactobacilos aislados de leche materna tenían la capacidad de inhibir un amplio rango de bacterias patógenas y de mejorar la función de barrera del intestino al potenciar la producción de mucinas y reducir la permeabilidad intestinal (Martín *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2006; Olivares *et al.*, 2006) (Figura 23).

Posteriormente, varios estudios demostraron el efecto preventivo de *L. fermentum* CECT5716 y *L. salivarius* CECT 5713 en un modelo de colitis experimental inducida por ácido trinitrobenceno sulfónico en ratas (Perán *et al.*, 2005; Perán *et al.*, 2006). En el caso de *L. salivarius* CECT 5713 este efecto se relacionó con

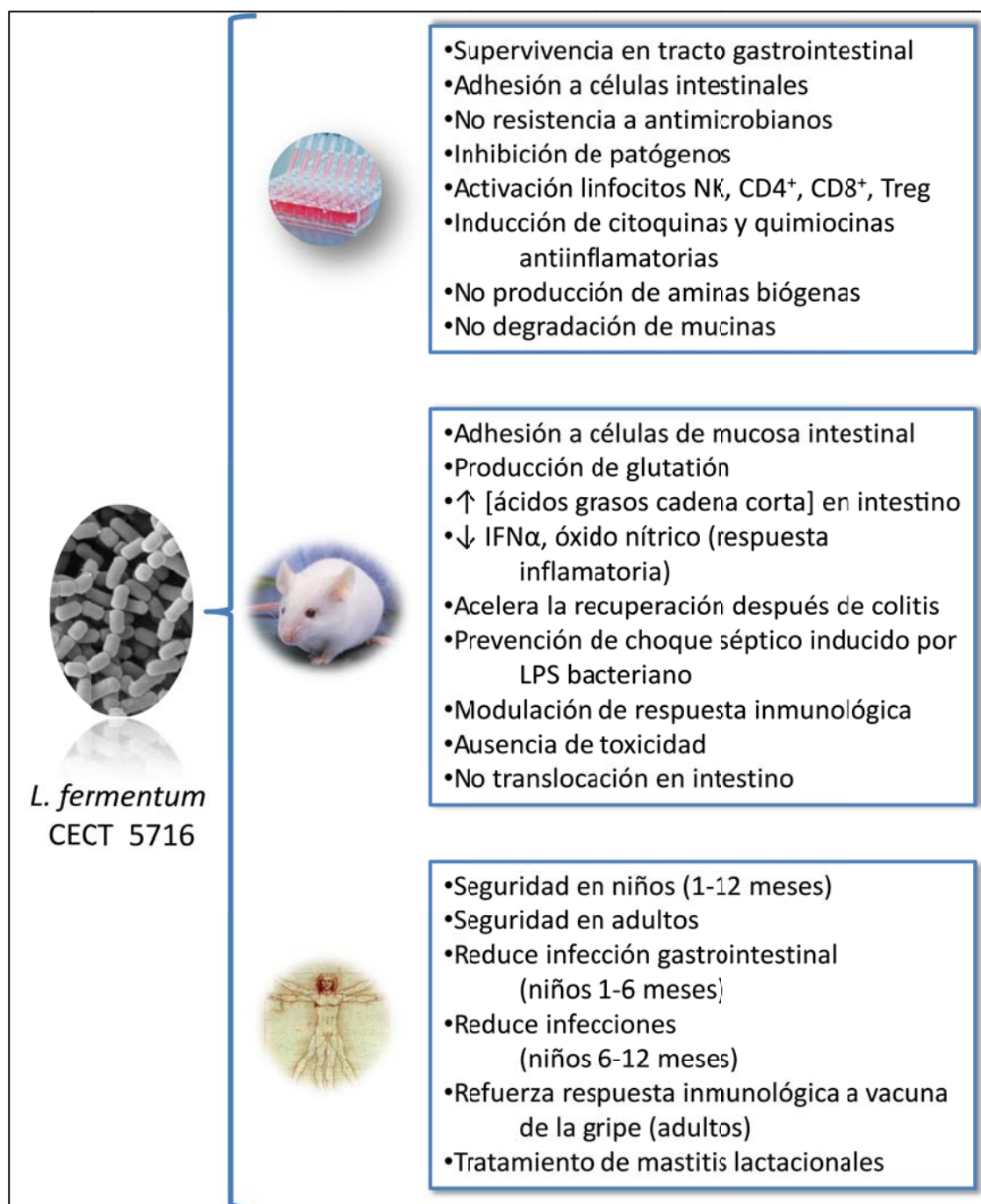


Figura 23. Evidencias disponibles sobre el carácter probiótico de *L. fermentum* CECT 5716, una cepa aislada de leche humana. Fuentes: Martín *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2006; Olivares *et al.*, 2006; Perán *et al.*, 2006; Mañé *et al.*, 2009; Arribas *et al.*, 2009; Díaz-Ropero *et al.*, 2007; Pérez-Cano *et al.*, 2010; Lara-Villoslada *et al.*, 2009; Olivares *et al.*, 2007; Gil-Campos *et al.*, 2012; Maldonado *et al.*, 2012; Maldonado-Lobón *et al.*, 2015; Arroyo *et al.*, 2010

su capacidad para aminorar la producción de algunas citoquinas implicadas en la respuesta inflamatoria, adherirse a las células de la mucosa intestinal e inhibir el crecimiento de otras bacterias (Perán *et al.*, 2005). La colonización intestinal por *L. fermentum* CECT 5716, la notable producción de glutatión por parte de esa cepa, el aumento de la concentración de ácidos grasos de cadena corta y la reducción de la producción de ciertos mediadores implicados en la respuesta inflamatoria (interferón α y óxido nítrico) son los mecanismos que podrían explicar el efecto beneficioso de esta cepa en ese modelo de enfermedad inflamatoria intestinal (Perán *et al.*, 2006). Además, en ese modelo, el efecto modulador de *L. fermentum* CECT 5716 fue superior al obtenido con *L. reuteri* ATCC 55730, una cepa cuya eficacia en colitis ha sido ampliamente demostrada tanto en modelos animales como en humanos (Perán *et al.*, 2007). *L. fermentum* CECT 5716 no solo atenúa las manifestaciones clínicas cuando se administra antes de inducir experimentalmente la colitis (probablemente por la producción de glutatión), sino que también acelera la recuperación de los animales (Mañé *et al.*, 2009). Esta cepa también tiene un efecto preventivo en un modelo de choque séptico inducido por lipopolisacárido bacteriano en ratones (Arribas *et al.*, 2009).

Otros estudios *in vitro* y ensayos *in vivo* con ratones han demostrado que *L. fermentum* CECT 5716 y *L. salivarius* CECT 5713 pueden modular la respuesta inmunológica, aunque con efectos opuestos. Mientras que *L. fermentum* CECT 5716 induce la producción de citoquinas proinflamatorias, *L. salivarius* CECT 5713 activa la producción de IL-10, por lo que es más efectiva (Díaz-Ropero *et al.*, 2007). También se ha comprobado *in vitro* que potencian la respuesta inmunológica innata y la adquirida, como se reflejaba en la fuerte activación de las poblaciones de linfocitos NK y en la, algo más moderada, de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y linfocitos T reguladores. Además, las dos cepas inducían la producción de una amplia gama de citoquinas y quimioquinas anti-inflamatorias (Pérez-Cano *et al.*, 2010). Es importante destacar que, en ambos estudios, los efectos observados eran específicos de cepa.

La seguridad de *L. fermentum* CECT 5716 y, en concreto, su potencial toxicidad y capacidad de translocación tras la administración por vía oral de dosis 10.000 veces superiores a las que consumirían normalmente los humanos, se ha demostrado en un modelo animal (Lara-Villoslada *et al.*, 2009). También se ha comprobado que la administración de la cepa a adultos humanos es segura; además, tiene una eficacia notable reforzando la respuesta inmunológica de la vacuna de la gripe (Olivares *et al.*, 2007).

Dos estudios clínicos han demostrado que *L. fermentum* CECT 5716 es segura y bien tolerada cuando se suministra en una fórmula de continuación a niños de entre 6 y 12 meses de edad y en una fórmula infantil de inicio a niños de entre 1 y 6 meses de edad (Gil-Campos *et al.*, 2012; Maldonado *et al.*, 2012). Además, el consumo de la fórmula infantil conteniendo *L. fermentum* CECT 5716 mejoró el estado de salud de

los niños (de 1 a 6 meses), reduciendo significativamente la incidencia de infecciones gastrointestinales (Gil-Campos *et al.*, 2012). Por otra parte, la administración de una fórmula de continuación que contenía esta cepa a niños (entre 6 y 12 meses) también limitó la incidencia de infecciones durante los seis meses que duró el estudio (Maldonado *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos en estos dos ensayos indican que *L. fermentum* CECT 5716 podría ser útil para prevenir infecciones gastrointestinales y respiratorias comunitarias en una población infantil. Recientemente se ha evaluado el efecto a largo plazo del consumo de una fórmula infantil suplementada con *L. fermentum* CECT 5716 en niños con 3 años de edad que habían participado en uno de los estudios anteriormente mencionados (Gil-Campos *et al.*, 2012; Maldonado-Lobón *et al.*, 2015). Los resultados reflejan la ausencia de efectos adversos derivados del consumo de esa fórmula, no constatándose diferencias en el crecimiento de los niños ni en la incidencia de enfermedades, infecciosas o no, ni en el perfil de la microbiota intestinal y de otros parámetros relacionados con la función intestinal (Maldonado-Lobón *et al.*, 2015).

La colonización intestinal de los niños prematuros suele ser anómala en comparación con los niños nacidos a término. La microbiota intestinal de los prematuros se caracteriza por tener menor diversidad bacteriana, menor presencia de bifidobacterias y una mayor concentración de patógenos, y tiene una repercusión directa en su salud (Wang *et al.*, 2009; Moles *et al.*, 2013). Recientemente, se ha analizado el efecto de la administración a prematuros de dos cepas aisladas de leche materna (*L. salivarius* PS12934 y *B. breve* PS12929) durante sus primeros días de vida. En primer lugar, se observó una mayor concentración de lactobacilos y bifidobacterias en las heces de estos niños, asemejándose a lo que suele observarse en niños sanos. Además, la administración de estos probióticos tuvo un efecto modulador del sistema inmunitario, observándose una disminución de calprotectina (un marcador de patología inflamatoria intestinal) en heces (Moles *et al.*, 2015).

Por otra parte, la actividad antibacteriana frente a los patógenos que están implicados habitualmente en las mastitis lactacionales (bacterias de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus*) y su origen han determinado que se evalúe la utilidad de algunas cepas de *Lactobacillus* aisladas de leche materna para el tratamiento de las mastitis. En un ensayo piloto inicial se comprobó la eficacia de la administración por vía oral de dos cepas de lactobacilos aislados de leche de mujeres sanas, *L. salivarius* CECT 5713 y *L. gasseri* CECT 5714, para aliviar los síntomas y recuperar la microbiota mamaria habitual tras un episodio de mastitis (Jiménez *et al.*, 2008). En un ensayo clínico posterior en el que participó un mayor número de mujeres se evaluó la efectividad, por separado, de la administración oral de *L. fermentum* CECT 5716 y *L. salivarius* CECT 5713 para el tratamiento de esa enfermedad; en ese mismo ensayo se compararon los resultados obtenidos con el empleo de probióticos y los del tratamiento antibiótico habitual. Las mujeres a las que se administró cualquiera de las dos cepas probióticas tuvieron una menor recurrencia de mastitis y sus síntomas mejoraron

mucho en relación con lo referido por las mujeres tratadas con antibióticos. Los resultados obtenidos confirman que estos probióticos son una buena alternativa a los antibióticos que se prescriben habitualmente para el tratamiento de las mastitis lactacionales (Arroyo *et al.*, 2010).

Más recientemente, el análisis metabólico de orina en mujeres con mastitis a las que se administró *L. salivarius* PS2, una cepa aislada de leche materna, ha revelado que el tratamiento con este probiótico disminuyó la excreción de lactosa, lo cual puede ser el reflejo de la restauración de la permeabilidad del epitelio de la glándula mamaria, y constató la existencia de otros cambios compatibles con la mejoría del estado de salud de las mujeres al final de la intervención (Vázquez-Fresno *et al.*, 2014).

La secuenciación y el análisis de los genomas de algunas cepas de BAL y bifidobacterias aisladas de leche materna está proporcionando pruebas adicionales relacionadas con su seguridad y su potencial como probióticos (Jiménez *et al.*, 2010a; Jiménez *et al.*, 2010b; Jiménez *et al.*, 2012; Langa *et al.*, 2012; Martín *et al.*, 2012).

II.4. EL QUESO

El queso es un nombre genérico con el que se asigna a un grupo de productos lácteos fermentados cuya elaboración se hace en prácticamente cualquier lugar del mundo, con una gran diversidad de aromas, sabores, texturas y formas (Fox y McSweeney 2004; da Cruz *et al.*, 2009). En esencia, es un concentrado de proteínas (caseínas) y grasa de la leche (Hill y Kethireddipalli, 2013). Es probable que este producto surgiera en la región conocida como Creciente Fértil, delimitada por los ríos Tigris y Éufrates (que abarcaba desde el sudeste de Turquía hasta la costa mediterránea) hace unos 8.000 años. En esa etapa tuvo lugar la domesticación de diferentes especies de plantas y animales, siendo la cabra y la oveja las primeras especies de las cuales el hombre consumió leche y, probablemente, surgiera el queso por obra del azar. Sin embargo, fue durante la dominación romana cuando la actividad quesera se asentó definitivamente en Europa convirtiéndose en un sector de gran importancia económica (Kosikowski, 1977; Fox y McSweeney 2004).

El crecimiento en la leche de bacterias capaces de utilizar la lactosa como fuente de energía y transformarla en ácido láctico provoca la precipitación de las caseínas cuando la cantidad de ácido producida es suficiente para reducir el pH de la leche hasta un valor próximo a 4,6. En esas condiciones, las caseínas coagulan y forman un gel inducido por la acidificación en el que quedan atrapadas la grasa y la fase acuosa del queso. Estos geles inducidos por la acidificación son bastante estables si no se agitan y son la base de numerosos productos fermentados. Por ruptura de este gel, accidental o intencionadamente, se obtienen dos fases diferenciadas que pueden consumirse por separado: una masa blanquecina y sólida con un sabor muy agradable denominada cuajada y otra líquida denominada suero. La cuajada se puede consumir fresca o almacenar para consumo futuro si se adiciona sal o se deshidrata. Estos quesos de coagulación ácida, que generalmente se consumen frescos, representan tan solo el 25% de la producción total (Fox y McSweeney, 2004).

Un mecanismo alternativo para coagular la leche se basa en el empleo de cuajo, que puede contener proteinasas de distintos orígenes (bacterias, mohos o tejidos vegetales y animales). Estas proteinasas modifican las caseínas y provocan su coagulación en determinadas circunstancias. La cuajada que se obtiene en este caso tiene un comportamiento mucho mejor durante la sinéresis y expulsa una mayor cantidad de suero que la obtenida por coagulación ácida. En consecuencia, los quesos que se obtienen son más estables porque tienen un menor contenido de humedad. La mayor parte de las variedades de queso (aproximadamente el 75%) se basan en este mecanismo de coagulación. Durante su almacenamiento, el crecimiento de ciertas bacterias y la acción del cuajo y las enzimas producidas por esas bacterias prosigue provocando cambios significativos en el sabor, aroma y textura del queso. Esto es lo que se denomina como maduración, durante la cual se desarrollan las características organolépticas distintivas de cada tipo de queso (Fox, 2002).

II.4.1. Definición y clasificación

La norma española de calidad para los quesos especifica que se entiende por queso “el producto fresco o madurado, sólido o semisólido, obtenido de la leche, de la leche total o parcialmente desnatada, de la nata, del suero de mantequilla o de una mezcla de algunos o de todos estos productos, coagulados total o parcialmente por la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados, antes del desuerado o después de la eliminación parcial de la parte acuosa, con o sin hidrólisis previa de la lactosa, siempre que la relación entre la caseína y las proteínas séricas sea igual o superior a la de la leche” (RD 1113/2006).

El queso es uno de los alimentos más versátiles disponibles hoy en día, atrayendo a muchos paladares y adecuado para todas las edades. Su consumo ha crecido en las últimas décadas y en la mayoría de los países, sin relación con el nivel socioeconómico del país. La producción mundial de queso en el año 2010 fue de 20,7 millones de toneladas, lo que representa un incremento de un 2,3% respecto al 2000 (FAO, 2012).

Debido a la gran diversidad de quesos y variedades existentes hay múltiples criterios para su clasificación (Fox, 2011b) (Figura 24). Algunos esquemas de clasificación tienen en cuenta características propias del producto como la textura, que está relacionada directamente con el contenido de humedad y su contenido de materia grasa. Otros están basados en parámetros tecnológicos como el tipo de coagulación. Actualmente se producen de 400 a 1000 variedades en todo el mundo que difieren en la materia prima empleada y en la composición química, condiciones de elaboración y maduración del queso. En la Tabla 13 se recoge la clasificación de los tipos de queso teniendo en cuenta el grado de maduración y su porcentaje de grasa sobre el extracto seco total.

En algunos países la producción de queso de forma artesanal es muy habitual como en Francia, Italia y España. Estos productos pueden tener el reconocimiento de Denominación de Origen Protegida (DOP) o Indicación Geográfica Protegida (IGP). En España hay 27 variedades de quesos con DPO, entre los que cabe mencionar el Manchego, el de Mahón, el de Tetilla y el de Idiazábal (Frutos Mejías y Ruíz Budría, 2012). Todas estas variedades de queso tienen una gran diversidad de sabor, aroma y textura como resultado de las distintas combinaciones y variaciones de los componentes básicos del queso: tipo de leche, cultivos iniciadores y/o adjuntos, tipo de coagulante, así como de las diferencias en el proceso de elaboración, fundamentales para definir las propiedades del producto final.

Tabla 13. Clasificación general de los distintos tipos de queso (Norma de calidad para los quesos, RD 1113/2006)

Grado de maduración	Porcentaje de grasa sobre extracto seco final
Fresco: listo para el consumo al finalizar el proceso de fabricación	
Blanco pasterizado: el coágulo se pasteriza y queda listo para el consumo al finalizar el proceso de fabricación	Extragraso: $\geq 60\%$ Graso: 45 – 60%
Madurado: debe mantenerse durante cierto tiempo y en condiciones que permitan los cambios físicos y químicos característicos del mismo	Semigraso: 25 – 45 % Semidesnatado: 10 – 25%
Madurado con mohos: la maduración se produce principalmente por el desarrollo de mohos en su interior, superficie o ambas partes	Desnatado: < 10%

II.4.2. Tecnología de elaboración del queso

A pesar de la variedad existente de quesos, la transformación de leche en queso requiere una serie de etapas básicas comunes a todos ellos: estandarización de la leche, coagulación, desuerado, moldeado, salado y afinado o maduración (Figura 25).

II.4.2.1. Estandarización de la leche

La estandarización de la leche, el primer paso en la elaboración del queso, permite ajustar la concentración de proteínas, grasas y calcio. La concentración de proteína es importante porque está directamente relacionada con la velocidad de formación del gel y la consistencia del coágulo, lo que se traduce en un mayor rendimiento en la transformación de leche en queso.

El equilibrio del calcio entre la fase soluble y coloidal, con un papel fundamental en la coagulación de la leche, cambia con la refrigeración y el tratamiento térmico por lo que habitualmente se suele añadir CaCl_2 (50 – 200 mg/L de leche). Otro parámetro que debe regularse antes de la adición del cuajo es el pH, del cual dependerá el tiempo de coagulación.

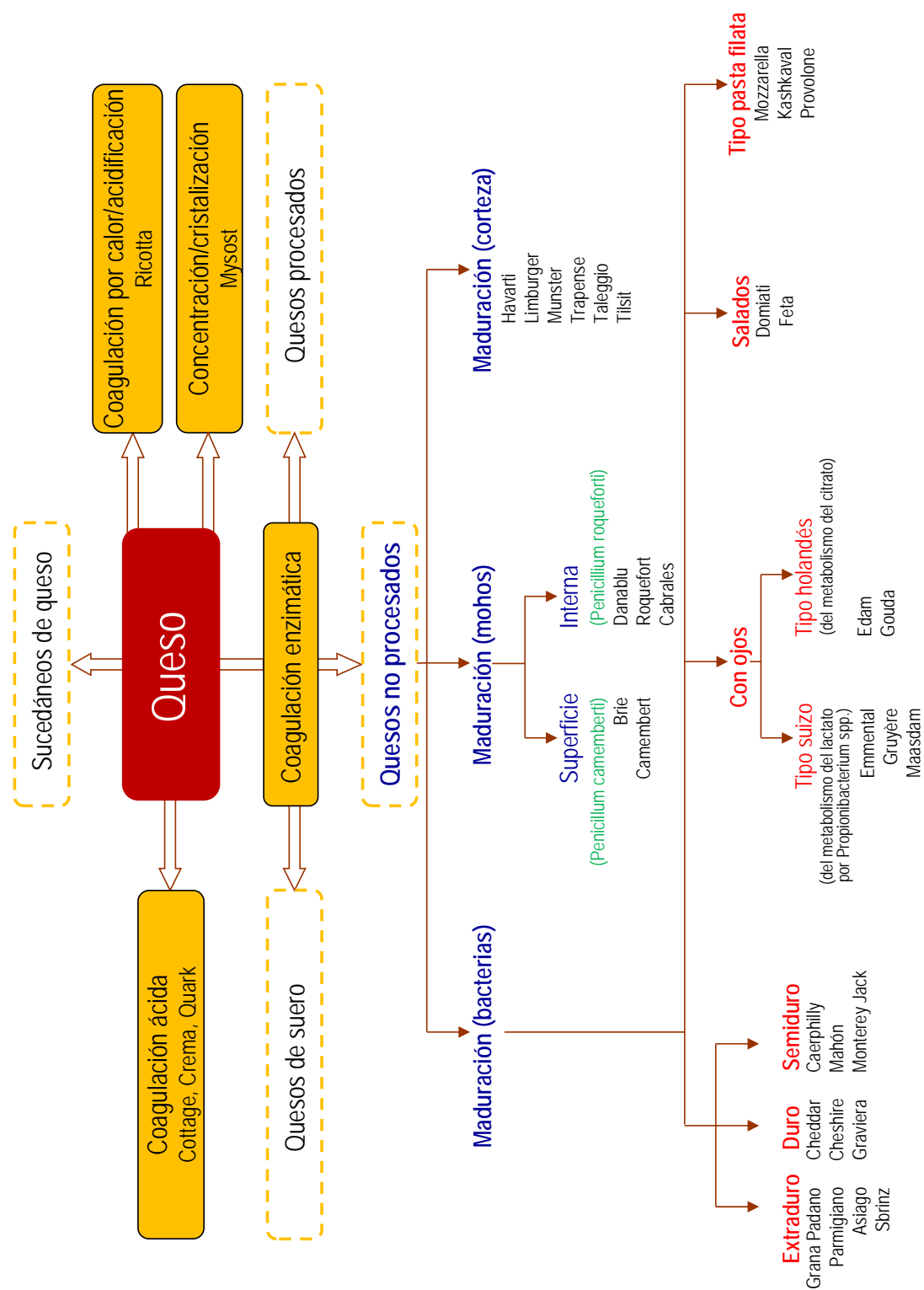


Figura 24. Esquema general de clasificación de quesos. Fuente: Fox (2011b).

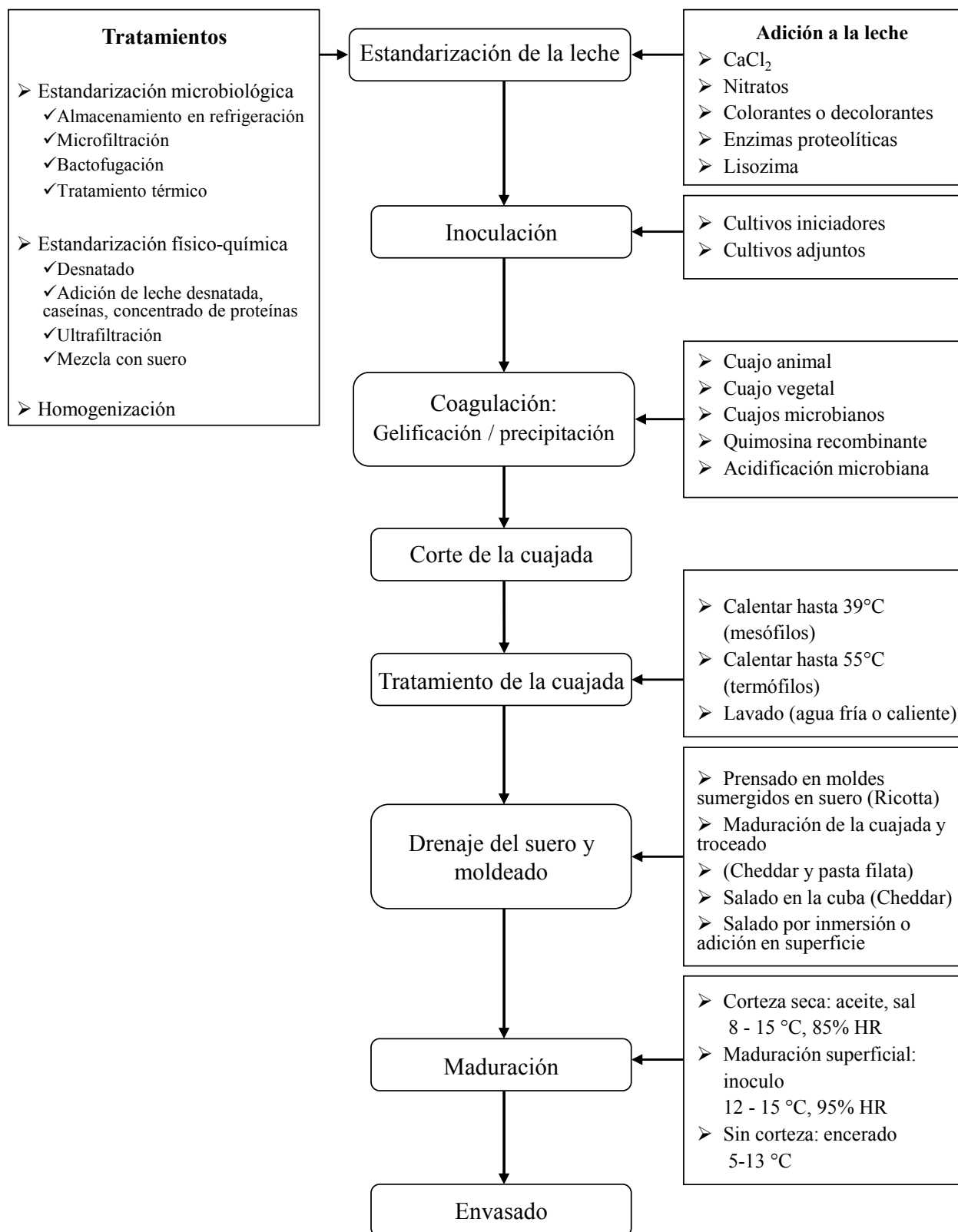


Figura 25. Diagrama de flujo básico de la elaboración de un queso tipo. Fuente: Hill y Kethireddipalli (2013).

Por otro lado, la leche debe adecuarse a unos estándares microbiológicos, para lo cual hay que eliminar los microorganismos no deseados mediante tratamientos térmicos, bactofugación y/o microfiltración. A continuación, se añaden los microorganismos deseados en forma de cultivo iniciador, que han de producir ácido rápidamente. El cultivo iniciador depende del tipo de queso, pero suele incluir bacterias de las especies *Lc. lactis*, *Str. thermophilus*, *L. delbrueckii* y/o *L. helveticus*. Es importante controlar la evolución del pH porque influye en la coagulación y las características de la cuajada (Lawrence *et al.*, 1987).

II.4.2.2. Coagulación

La coagulación de la leche es el resultado de las modificaciones físico-químicas que ocurren en las micelas de caseínas y que conducen a la formación de un gel. La micela de caseína está formada por la asociación de caseínas (α_{s1} , α_{s2} , β y κ), fragmentos peptídicos y fosfato cálcico coloidal. Una fracción de las caseínas es sensible a la presencia de calcio y precipita cuando la concentración de calcio es superior a 6 mM. Sin embargo esta fracción es estable en la leche, a pesar de que la concentración de calcio es superior, gracias a la caseína κ que se encuentra fundamentalmente en la superficie de la micela y forma complejos estables con las caseínas α_{s1} y β . En estos complejos, el fragmento de la caseína κ comprendido entre los residuos 1 y 106, que tiene carácter hidrófobo, se asocia con el resto de las fracciones de caseína, mientras que el otro extremo de la molécula, con perfil hidrófilo, está orientado hacia el exterior de la micela (McSweeney, 2007).

La coagulación de la leche se puede realizar por vía ácida o enzimática, pero los mecanismos que intervienen en la formación del coágulo son totalmente diferentes, al igual que las características de la cuajada resultante. La coagulación ácida ocurre a un pH próximo a 4,6. Estas condiciones de acidez pueden alcanzarse por la actividad del cultivo iniciador o por la adición de ácidos orgánicos, como cítrico, acético o láctico. A estos valores de pH aumenta la solubilidad del calcio micelar provocando la desorganización de la micela y la desnaturalización de la caseína; la cercanía del pH al punto isoeléctrico de la caseína provoca su precipitación. El coágulo ácido obtenido es permeable, tiene una elevada friabilidad, es muy poco elástico y poco resistente a los tratamientos mecánicos. Todas estas características se deben a la escasa estructuración del gel.

La coagulación enzimática de la leche se debe a proteasas de diversos orígenes, siendo las más usadas en la elaboración de quesos madurados las extraídas del estómago de los terneros lactantes. Estas proteasas provocan la ruptura limitada del enlace peptídico entre los residuos de fenilalanina y metionina en posiciones 105-106 de la caseína κ , seguido de la agregación del Ca^{2+} liberado por la desestabilización de la micela. En este proceso se distinguen dos fases. En la fase primaria o enzimática la caseína κ se hidroliza, obteniéndose *para*- κ -caseína y caseinomacropéptido. En la fase

secundaria tiene lugar la coagulación porque, al separarse el caseinomacropéptido de la caseína κ , la micela pierde el carácter hidrófilo. Entre esas micelas modificadas se promueven uniones de carácter hidrofóbico y electrostático, preparándose para la formación del gel. Finalmente las micelas se agregan y reorganizan al formarse nuevos enlaces de fosfato cálcico y puentes disulfuro entre las moléculas de *para*- κ -caseína formándose un gel firme, uniforme, elástico y no muy permeable (Fox *et al.*, 2004).

II.4.2.3. Desuerado

Para eliminar la mayor parte del suero que se encuentra retenido en el coágulo, la cuajada se corta, desuera y calienta. El desuerado, que se corresponde con una sinéresis, se favorece con la temperatura elevada y valores de pH bajos. El corte de la cuajada se hace mediante liras para obtener granos de $2 - 3 \text{ cm}^3$, según el tipo de queso (el de menor tamaño para quesos tipo Emmental y el mayor para los quesos blandos). Después del corte, la agitación de los granos de cuajada facilita la expulsión del suero. Una parte de éste permanecerá en los capilares de los granos de cuajada y va a influir en la acidez y humedad del producto final.

II.4.2.4. Salado

El salado, última operación antes del prensado, también puede ser la primera etapa de la maduración si se hace una vez que el queso ha sido moldeado y prensado. El salado cumple varias funciones en la elaboración del queso, entre las que se encuentra actuar como conservante, acentuar el sabor, reducir la actividad metabólica de los cultivos iniciadores, detener o evitar el desarrollo de microorganismos indeseables, ayudar a seleccionar la microbiota secundaria en el queso, formar una corteza más resistente y protectora y contribuir a la textura del queso. El salado afecta la maduración porque influye en la producción de ácidos orgánicos, promueve la sinéresis de la cuajada, reduce la actividad de agua (a_w) y regula la actividad enzimática (Murtaza *et al.*, 2014).

La adición de sal se puede hacer a la cuajada, al suero, sobre la superficie del queso o por inmersión del queso en una salmuera. El tiempo necesario para que la sal penetre en el queso varía de 1 a 4 días para quesos semiduros, pero en algunos quesos duros puede requerir hasta 10 días (Guinee, 2004).

II.4.2.5. Maduración o afinado

El queso que se obtiene tras el proceso de salado suele caracterizarse por tener una textura húmeda y elástica y un sabor y aroma suaves típicos de la leche fermentada. Estos quesos frescos suelen consumirse inmediatamente. Otras variedades requieren una maduración (desde meses hasta años) para desarrollar las características deseadas. Durante la maduración la cuajada va a sufrir una serie de cambios físicos, químicos, microbiológicos y enzimáticos que van a transformar los principales

componentes del queso (lactosa, caseínas y grasa) y formar diferentes compuestos como aminas, aldehídos, cetonas y ácidos grasos libres, entre otros. Todos ellos contribuyen a las características organolépticas típicas de cada variedad de queso (Figura 26) (McSweeney, 2004, 2011).

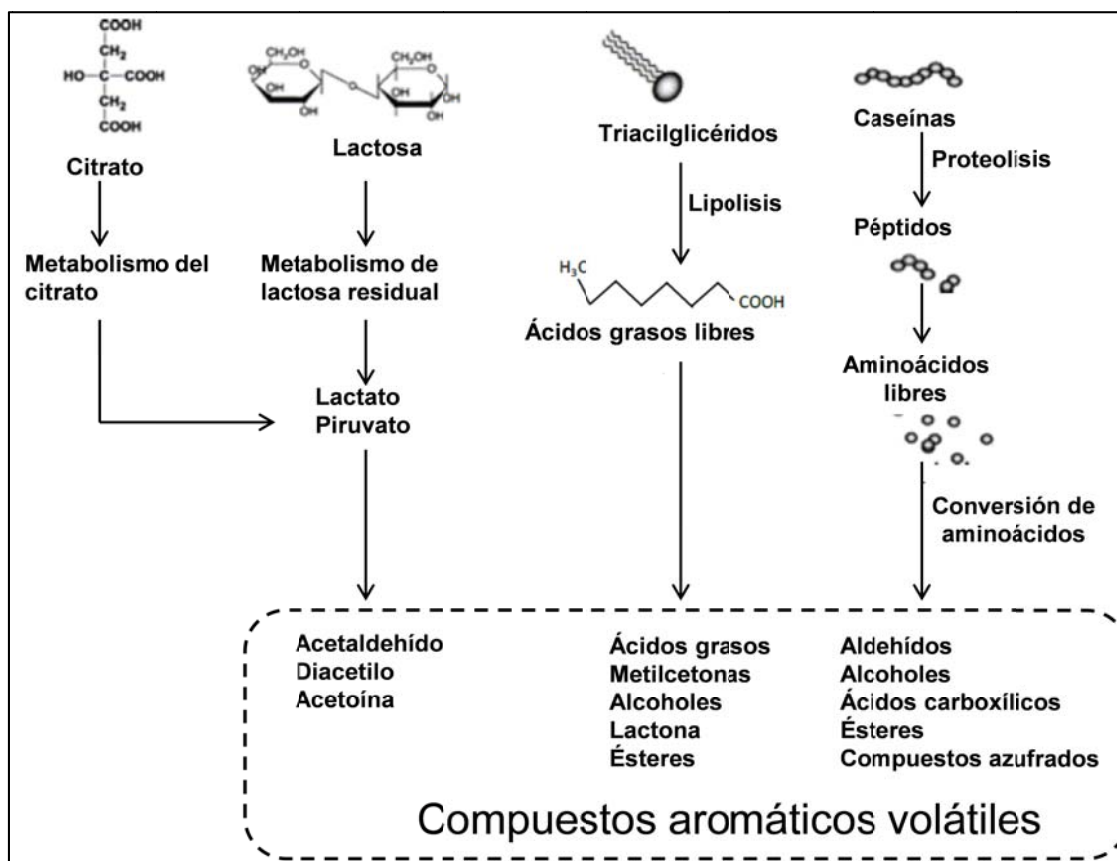


Figura 26. Transformaciones bioquímicas básicas durante la elaboración de queso.
Fuente: Marilley y Casey (2004).

Los microorganismos juegan un papel fundamental en la maduración, ya sea de forma directa o mediante la liberación de enzimas después de su autólisis (Fox *et al.*, 2004; Martínez-Cuesta *et al.*, 2006). La diversidad de la microbiota del queso dependerá de la tecnología que se utilice para su elaboración así como de las condiciones en que se haga la maduración (Medina *et al.*, 2007). Los microorganismos pueden proceder de la materia prima (leche cruda), pero también se pueden adicionar durante la fabricación como cultivos iniciadores y/o adjuntos. La contribución de la microbiota propia de la leche juega un papel fundamental en los quesos elaborados a partir de leche cruda. La mayoría de los microorganismos presentes en la leche cruda se destruyen durante la pasteurización, aunque las bacterias de los géneros *Micrococcus*, *Microbacterium* y *Enterococcus* pueden sobrevivir y formar parte de la microbiota del queso.

El momento de adición de los cultivos secundarios o adjuntos depende de la variedad de queso. En cuanto a su composición, suelen estar formados por BAL distintas a las que forman los cultivos iniciadores, generalmente de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Leuconostoc*, bacterias productoras de ácido propiónico (como *Propionibacterium freudenreichii* responsable de los “ojos” típicos de variedades de queso tipo suizo), mohos en variedades tipo Camembert y bacterias y levaduras que crecen en la superficie de algunos tipos de quesos de pasta blanda y corteza lavada. Durante la maduración se producen importantes cambios microbiológicos que incluyen, por una parte, la lisis de los cultivos iniciadores y, por otra, el crecimiento y desarrollo de los cultivos secundarios (Beresford y Williams, 2004).

II.4.3. Cambios bioquímicos durante la maduración de los quesos

Los cambios bioquímicos que tienen lugar durante la maduración se pueden agrupar en eventos primarios y secundarios (Figura 26). Los primeros incluyen el metabolismo de la lactosa residual, el lactato y el citrato por parte de los microorganismos supervivientes de los cultivos iniciadores y/adjuntos, así como los procesos de lipólisis y proteólisis que serán catalizados por las enzimas del cuajo, de la leche y de los cultivos utilizados. A continuación, se producen múltiples reacciones secundarias como son el metabolismo de los ácidos grasos y de los aminoácidos, de gran relevancia para el desarrollo de muchos compuestos volátiles y sápidos como aminas, aldehídos, cetonas, ácidos grasos libres, etc. (McSweeney y Susa 2000, McSweeney 2011).

II.4.3.1. Metabolismo de la lactosa residual y de lactato y citrato

Aunque la mayor parte de la lactosa presente en la leche se pierde con el desuerado, en los granos de cuajada puede quedar alrededor de un 2% del contenido inicial (McSweeney, 2004). El lactato generado por la fermentación de esta lactosa puede ser oxidado por las BAL formándose acetato, etanol, formiato y CO₂, según el tipo de cultivo adjunto y de la disponibilidad de oxígeno, que a su vez dependerá del tamaño del queso y la permeabilidad al oxígeno de la cubierta (Fox *et al.*, 2000). El metabolismo del lactato es importante en algunas variedades de quesos como el Emmental que se caracteriza por el desarrollo de grandes ojos durante la maduración. Por otro lado, en las variedades de queso con mohos (*Geotrichum* o *Penicillium*) en la superficie el lactato se transforma en CO₂ y H₂O y se produce un característico aumento del pH (Fox *et al.*, 1990).

La concentración de citrato en la leche es baja (aproximadamente 8 mM) y la mayor parte se pierde en el suero. En la cuajada sólo queda una pequeña cantidad pero puede ser metabolizada por algunas bacterias y dar como resultado CO₂, que es fundamental en variedades de queso tipo suizo como el Edam y el Gouda. Además, el citrato también es un precursor de compuestos aromáticos, como el diacetilo, en ciertos

quesos donde se emplean cultivos iniciadores mesófilos, como se describió en el apartado II.2.6 (Figura 26) (Fox *et al.*, 1990; Cogan y Hill 1993, McSweeney y Fox 2004).

II.4.3.2. Lipolisis

Durante la maduración, en casi todas las variedades de quesos los triacilglicéridos son hidrolizados y los ácidos grasos resultantes inciden en el aroma y sabor del producto final, ya sea directamente o como precursores de otros compuestos aromáticos (Figura 26). Los principales agentes lipolíticos en el queso provienen de la propia leche, del cuajo o de la microbiota del queso (cultivos iniciadores y/o adjuntos).

Las lipasas endógenas de la leche, cuya función fisiológica es la hidrólisis de los triacilglicéridos plasmáticos, actúan fundamentalmente sobre triacilglicéridos formados por ácidos grasos de cadena media. Estas enzimas sólo son importantes en los quesos elaborados a partir de leche cruda ya que se inactivan durante la pasteurización. Por otro lado, los cuajos comerciales están en su mayoría libres de lipasas, aunque en ciertas variedades de quesos duros italianos, como el Provolone o el Pecorino, y en los quesos griegos tipo Feta se utiliza cuajo natural obtenido de la maceración del estómago de cordero o cabrito lechal y, en este caso, además de la pepsina, existe una alta concentración de lipasas pregástricas; estas enzimas actúan fundamentalmente sobre ácidos grasos de cadena corta.

En otras variedades de quesos elaborados a partir de leche pasteurizada, como el Cheddar y el Gouda, los principales procesos lipolíticos durante la maduración son el resultado de la acción de las lipasas y esterases microbianas (apartado II.2.6). La mayoría de estas enzimas son intracelulares y se liberan durante la lisis celular, por lo que tienen un mayor protagonismo en quesos con un largo período de maduración y son más activas con ácidos grasos de cadena corta. Una de las lipasas intracelulares más potentes que se conocen dentro de las BAL es la de *P. freudenreichii*. Sin embargo, los organismos más lipolíticos asociados a los quesos son *Penicillium* spp. En concreto, *Penicillium roqueforti*, que posee dos lipasas, causa una elevada lipolisis en los quesos azules. Por su parte, la lipasa extracelular de *Penicillium camemberti* participa en la liberación de ácido butírico (McSweeney, 2004).

II.4.3.3. Proteolisis

Dentro de los cambios bioquímicos que tienen lugar durante la maduración del queso, la proteólisis tiene un papel fundamental. Las enzimas que participan en la proteólisis provienen de la leche (plasmina), del cuajo (principalmente quimosina) y de las bacterias del cultivo iniciador y/o de los cultivos secundarios (Fox, 1989 y 1993; Fox y McSweeney, 1996).

La intensidad de la proteólisis depende de la variedad de queso; en el queso Mozzarella es débil, mientras que en los quesos azules es más elevada (McSweeney y Fox, 1997; Smit *et al.*, 2000). La proteólisis determina, al menos en parte, la textura del queso por la hidrólisis de las caseínas, la disminución de la a_w (por los grupos carboxilo y amino liberados) y el aumento de pH provocado por el NH_3 procedente de las reacciones de desaminación. Algunos péptidos formados son de especial interés por su carácter amargo, que puede ser un defecto en algunos tipos de queso. Como consecuencia de la proteólisis, se liberan aminoácidos que, a su vez, son sustrato de reacciones de desaminación, descarboxilación, transaminación y desulfuración originando compuestos aromáticos (apartado II.2.6), muchos de los cuales se liberan durante la masticación (Fox y McSweeney, 1996).

II.4.4. El queso como vehículo de probióticos

Tradicionalmente las leches fermentadas y los yogures han sido los productos más utilizados como vehículo de las bacterias probióticas. Sin embargo, algunas características, como el pH ácido o la presencia de sustancias inhibidoras generadas por el cultivo iniciador, pueden incidir negativamente en la viabilidad de los probióticos. De hecho, varios estudios han demostrado que algunas leches fermentadas comerciales conteniendo probióticos no cumplen las especificaciones sobre la concentración requerida de células viables del probiótico (Shah y Lankaputhra, 1997; Dave y Shah, 1997).

El queso se considera una alternativa ventajosa, en comparación con las leches fermentadas, como vehículo de bacterias probióticas por varios motivos. En primer lugar, el queso suele tener un pH menos ácido, una consistencia más sólida y un contenido en grasa superior. Todos estos factores brindan una protección adicional a las bacterias probióticas durante la elaboración y el almacenamiento del producto, así como durante su paso por el tracto gastrointestinal (Ross *et al.*, 2005; Stanton *et al.*, 1998). Estos hechos, junto con el carácter tan versátil del queso y su amplio consumo por la mayor parte de la población, abren nuevas oportunidades de mercado y permite ofrecer al consumidor otro tipo de productos probióticos (Gomes *et al.*, 2011; Karimi *et al.*, 2011)

Numerosos estudios avalan la posibilidad de elaborar distintas variedades de quesos probióticos (Tabla 14). La mayoría de las bacterias utilizadas en la fabricación de quesos probióticos pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aunque en estudios recientes se han empleado cepas de *Enterococcus* y *Propionibacterium* (Gardiner *et al.*, 1999; Saavedra *et al.*, 2003). Los probióticos pueden ser incorporados como cultivo iniciador o adjunto, aunque el primer caso es poco frecuente ya que la mayoría de las cepas no tiene una capacidad acidificante destacable. Además, los probióticos no suelen multiplicarse activamente durante la elaboración y maduración, probablemente por las condiciones de acidez de la matriz

Tabla 14. El queso como vehículo de probióticos.

Queso	Probiótico	Observaciones	Referencia
Blanco	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 593N	Aumenta la proteólisis Mejora el sabor y la textura Mejor aceptación	Kasimoglu <i>et al.</i> (2004)
De cabra	<i>B. lactis</i> <i>L. acidophilus</i> Ki		Gomes y Malacata (1998)
Cheddar	<i>B. bifidum</i> ATCC 15696		Dinakar y Mistry (1994)
	<i>B. infantis</i> ATCC 27920G	Sin cambios en características organolépticas	Daigle <i>et al.</i> (1999)
	<i>B. lactis</i> Bb-12		McBrearty <i>et al.</i> (2001)
	<i>B. longum</i> BB536		Phillips <i>et al.</i> (2006)
	<i>L. acidophilus</i> ^a		
	<i>Bifidobacterium</i> spp. ^a		
	<i>L. casei</i> ^a		
	<i>L. paracasei</i> ^a		
	<i>L. rhamnosus</i> ^a		
	<i>L. acidophilus</i> 4962	Mayor concentración de ácido acético	Ong <i>et al.</i> (2006)
	<i>L. acidophilus</i> LAFTI L10	Mayor concentración de aminoácidos libres	
	<i>L. casei</i> 279	Aumenta la proteólisis durante la maduración	
	<i>L. paracasei</i> LAFTI L26		
	<i>B. lactis</i> LAFTI B94		
	<i>B. longum</i> 1941		
	<i>L. plantarum</i> K25		
		Pequeño aumento en la concentración de aminoácidos libres	Zhang <i>et al.</i> (2013)
		Aumenta mucho la concentración de ácido aspártico	
		Disminución de niveles de colesterol <i>in vivo</i>	
Crescenza	<i>B. bifidum</i>	Mayor actividad peptidásica	Gobbetti <i>et al.</i> (1998)
	<i>B. longum</i>	Aumenta la concentración de ácido láctico y acético	
	<i>B. infantis</i>	No cambian las propiedades organolépticas	
	<i>L. acidophilus</i> H5	Incremento en proteólisis y lipólisis	Burns <i>et al.</i> (2008)
	<i>L. paracasei</i> A13	Aumenta la concentración de ácido linoléico (C18:2)	
Cottage	<i>B. infantis</i> ATCC27920G		Blanchette <i>et al.</i> (1996)
Fresco	<i>B. bifidum</i>		Vinderola <i>et al.</i> (2000)
	<i>B. longum</i>		
	<i>L. acidophilus</i>		
	<i>L. casei</i>		

las bajas temperaturas de almacenamiento. Por este motivo, generalmente se inoculan a la concentración final deseada en el producto; en otras ocasiones, se enriquece el producto con cisteína, extracto de levadura o hidrolizados de caseína para potenciar su crecimiento (Gomes *et al.*, 1995; Gomes y Malcata, 1998).

En los quesos con probióticos es primordial vigilar la supervivencia de los microorganismos no solo durante el proceso tecnológico, sino también durante la maduración y la vida útil del producto, especialmente en los que tienen largos tiempos de maduración. La supervivencia en una matriz como el queso dependerá de la cepa pero, en general, los probióticos utilizados deben ser tolerantes al ácido y la sal y compatibles con el cultivo iniciador. Los quesos tipo Cheddar han sido los más utilizados para el desarrollo de quesos probióticos, aunque también se han evaluado con éxito otras alternativas, como el queso fresco (Tabla 14).

También es importante comprobar que la presencia del probiótico no afecte al iniciador ni a las características organolépticas del queso; en el caso de que los cambios provocados por las enzimas de los probióticos sean relevantes, se espera que los consumidores los perciban como positivos (Souza *et al.*, 2008). Los datos disponibles hasta la fecha indican que los probióticos no suelen alterar la composición del queso y generalmente no tienen una actividad proteolítica destacable sobre las caseínas. Sin embargo, algunas cepas liberan peptidasas que pueden incidir en la proteólisis secundaria habitual en muchas variedades de quesos durante la maduración (McSweeney, 2004; Bergamini, 2006).

Uno de los requisitos para que un alimento con un probiótico sea considerado funcional y pueda llevar una alegación nutricional es demostrar que ejerce un beneficio en la salud del consumidor. Sin embargo, en muy pocas ocasiones se ha demostrado el efecto de las bacterias probióticas cuando están vehiculadas en un queso. Cabe citar el estudio descrito por Medici *et al.* (2004), quienes pusieron de manifiesto que el consumo de un queso fresco elaborado con *B. bifidum* A12, *L. acidophilus* A9 y *L. paracasei* A13 durante 8 semanas tuvo un efecto inmunomodulador en un modelo animal *in vivo*. También se ha comprobado *in vivo* el efecto hipocolesterolémico del consumo de queso Cheddar conteniendo *L. plantarum* K25 durante 4 semanas; la relación colesterol LDL/HDL disminuyó en un 44%, mientras que la de colesterol total/HDL lo hizo en un 32%, lo que podría reducir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Zhang *et al.*, 2013).

III. PROPIEDADES DE INTERÉS TECNOLÓGICO DE UNA COLECCIÓN DE BAL Y BIFIDOBACTERIAS AISLADAS DE LECHE HUMANA

Manuscrito en preparación

III.1. ABSTRACT

Human milk has been shown to contain a diverse microbiota. More than 200 different species, including staphylococci, lactic acid bacteria and bifidobacteria, have been isolated from human milk samples. Their physiological role has been linked to the initiation of the bacterial colonization of the infant gut, the protection of the infant gut and the contribution to the maturation of the immune system. Some lactobacilli isolated from human milk have been characterized and shown to have probiotic potential. In this work, a collection of 32 strains of bacteria isolated from human milk were tested for technological relevant properties for dairy industry, and the results were compared with those obtained with strains isolated from other human sources and the dairy environment. The results were highly variable depending on the strain but globally scarce ability to produce acid and low proteolytic activity in milk was observed for most of the strains isolated from human milk. Some *Streptococcus salivarius* and *Lactobacillus salivarius* strains exhibited intense aminopeptidase activity; only *Streptococcus* spp. and *Lactobacillus gastricus* strains showed a noticeable activity on esterase substrates. When the values for each technological property were analyzed as a function of the bacterial taxonomic group and origin, significant differences were found between the different bacterial genera but not between strains isolated from human milk or from other sources.

III.2. INTRODUCTION

Lactic acid bacteria (LAB) comprise a heterogeneous group of Gram-positive bacteria which produce lactic acid as the major end product after carbohydrate metabolism (Fellis and Dellaglio, 2007). This group includes many different genera, although most of the scientific and commercial interest relays on those belonging to the families *Lactobacillaceae* (*Lactobacillus* and *Pediococcus*), *Leuconostocaceae* (*Oenococcus* and *Leuconostc*), *Enterococcaceae* (*Enterococcus*), and *Streptococcaceae* (*Lactococcus* and *Streptococcus*) (Stiles and Holzapfel, 1997; Doyle *et al.*, 2013). LAB have adapted to and are found in many nutrient-rich environments, ranging from food (milk, meat, cereals) to mucosal surfaces (oral cavity, gastrointestinal tract, vagina) in humans and other animals (Douillard and de Vos, 2014). Bifidobacteria are Gram-positive bacteria mainly associated with the digestive tract of mammals that also produce lactic acid but always in combination with acetic acid (Fellis and Dellaglio, 2007).

LAB have a great economic importance because they are the most frequently used bacteria in both artisan and industrial food fermentations, mainly in the production of dairy products (yoghurt, cheese, butter, sour milk, buttermilk, kefir...). The fast production of organic acids, the consumption of nutrients in milk and/or the production of different antimicrobial compounds, such as bacteriocins, have a preservative effect by controlling the growth of spoilage microorganisms (Carret *et al.*, 2002; Moll *et al.*, 1999). In fact, LAB are being exploited as biocontrol agents; their Qualified Presumption of Safety (QPS) status in the EU and Generally Regarded as Safe (GRAS) status in the USA make them an attractive alternative to traditional food preservatives (Gálvez *et al.*, 2007; Elsser-Gravesen and Elsser-Gravesen, 2014).

Traditionally, LAB used as starter or adjunct cultures also contribute to flavor, aroma and texture development in the final product (Leroy and de Vuyst, 2004; Reginensi *et al.*, 2012). Therefore, many of their technological properties are important criteria for the selection of new cultures including, among others, lactose metabolism, proteinase, aminopeptidase and esterase activities, production of volatiles compounds, resistance to bacteriophages and production of inhibitory compounds (Doyle *et al.*, 2013). In fact, the control over the activities of LAB peptidases is a key target in cheese ripening technology (Beresford, 2004).

In addition, LAB and *Bifidobacterium* strains have been associated for decades with health benefits linked to the consumption of fermented milk products, and some strains are well known for their probiotic characteristics (Aureli *et al.*, 2011). These microorganisms are the most frequently used in the manufacture of probiotic foods mainly in the dairy industry (Shiby and Mishra, 2013).

Several studies have confirmed that human milk contains a peculiar microbiota, including strains of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus*

rhamnosus, *Lactobacillus salivarius*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve* o *Bifidobacterium longum* (Arbolea *et al.*, 2011; Heikkilä and Saris, 2003; Martín *et al.*, 2003; Martín *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2009; Martín *et al.*, 2012). The origin of these microorganisms is particularly attractive for their use in dairy industry; in fact, human milk has been regarded as an important source for selection of probiotic bacteria because of the oligosaccharides and other potentially prebiotic compounds that it contains (Martín *et al.*, 2005; Fontana *et al.*, 2013).

The objective of this work was to study different technological properties (acidification and proteolytic, peptidase and esterase activities) in a collection of bacteria isolated from human milk of healthy women in order to evaluate their potential application in the manufacture of dairy products.

III.3. MATERIAL AND METHODS

III.3.1. *Bacterial strains and growth conditions*

A total of 32 strains isolated in previous studies from milk of healthy women (Martín *et al.*, 2003; Martín *et al.*, 2011; Martín *et al.*, 2012; Marín *et al.*, 2009) and 23 strains from other sources, including other human samples, starter cultures and commercial probiotic strains maintained in our laboratory collection were included in this study (Table 1). *Enterococcus* (n=13), *Lactobacillus* (n=25), *Lactococcus* (n=3) and *Streptococcus* (n=9) strains were cultured in De Man, Rogosa and Sharpe (MRS, Oxoid, Basinstoke, UK), while MRS broth supplemented with 0.25% (w/v) L-cysteine (MRS-C) was used for *Bifidobacterium* (n=5) strains. All bacteria were incubated at 37°C for 24 h in aerobic conditions, with the exception of *Lactococcus* strains that were incubated at 32°C and *Bifidobacterium* strains that were grown at 37°C in anaerobic conditions (85% N₂, 10% H₂, and 5% CO₂) using a Mini-MACS working station (Don Whitley Scientific Limited, Shipley, UK). The bacterial strains were maintained as frozen (-80°C) stocks after mixing equal amounts of 50% (v/v) glycerol and a MRS or MRS-C broth culture.

III.3.2. *Acidifying capacity*

Heat-treated (121°C, 5 min) reconstituted 10% (w/v) skimmed milk (HT-RSM) (Oxoid) was used to evaluate the acidifying activity of the bacterial strains included in this study. The bacterial strains were grown in MRS or MRS-C broth and, then, transferred to HT-RSM at the appropriate temperature before inoculation (1%, v/v) of HT-RSM. The pH and the titratable acidity were measured after aerobic incubation for 6, 12 and 24 h at 30°C. The titratable activity, which is a measure of the sum of all the organic acids present, was determined by titration with 0.11 M NaOH in the presence of phenolphthalein as indicator to reveal the titration end point and was expressed as the equivalent amount of lactic acid produced (g/100 mL of milk). Both parameters, pH and titratable acidity, were estimated using two replicates in duplicate experiments for each bacterial strain.

III.3.3. *Proteolytic activity*

The proteolytic activity was determined using the *o*-phthaldialdehyde spectrophotometric assay (OPA test) that is based on the reaction of α -amino groups released by proteolytic enzymes with *o*-phthaldialdehyde and β -mercaptoethanol which forms a complex that absorbs at 340 nm (Church *et al.*, 1983). The bacterial strains were first grown in MRS or MRS-C broth at the appropriate temperature. Then, bacteria from fully grown cultures were washed twice with PBS (0.32 mM phosphate buffered saline, pH 7.2) before being used to inoculate (1%, v/v) HT-RMS that was incubated at 30°C for 24 h. After protein precipitation, the proteolytic activity was expressed as the increase in OD₃₄₀ with respect to that of an uninoculated control milk

sample. The measurement was done in two replicates of duplicate experiments for each bacterial strain.

III.3.4. *Peptidase and esterase activities*

Peptidase and esterase activities were tested in cell-free extracts (CFE) of bacteria that had been grown until they had reached the stationary phase. Bacteria from fully grown cultures were concentrated by centrifugation at $19,000 \times g$ for 10 min, washed with cold NaCl (0.85%, w/v), and suspended in 0.50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 in order to achieve a 100-fold concentration factor. The concentrated cells were disrupted by mixing with the same amount of 0.1 mm diameter zirconia/silica beads (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and shaking in a Fast Prep FP120 (QBioGene, Irvine, CA, USA) at 5 m s^{-1} for 15 s; this treatment was made four times and cells were kept in ice between cycles. Cell debris were removed by centrifugation at $19,000 \times g$ for 15 min at 4°C and the CFE was kept at -20°C until use. Protein content of CFEs was determined using a commercial reagent (Bio-Rad Laboratories, Madrid, Spain) based on the Bradford dye-binding assay with bovine serum albumin as standard.

Peptidase activities in CFEs were measured following the spectrophotometric method described by Sarantinopoulos *et al.* (2001), adapted to a multiwell plate format, using 4-nitroanilide (*p*NA) derivatives of amino acids (specifically, L-alanine *p*-NA (Ala-*p*NA), L-leucine *p*-NA (Leu-*p*NA), L-lysine *p*-NA (Lys-*p*NA), L-proline *p*-NA (Pro-*p*NA) and glycyl-proline *p*-NA (Gly-Pro-*p*NA) from Sigma) as chromogenic substrates. Peptidase activity assays were performed in triplicate in two independent experiments. Specific peptidase activity was expressed as nmol of *p*-nitroaniline released per mg of protein in CFE and hour.

Esterase activities in CFEs were quantified using α -naphthyl (α NA) derivatives of acetate (α NA-C2), propionate (α NA-C3), butyrate (α NA-C4) and caproate (α NA-C6) (Sigma) as substrates according to the method described by Abejón *et al.* (2006) that was adapted to a multiwell plate format. Esterase activity assays were also performed in triplicate in two independent experiments. Specific esterase activity was expressed as μmol of α -naphthol released per mg of protein in CFE and hour.

III.3.5. *Statistical analysis*

The experimental results are presented as mean values and standard deviations. The normality of data, homogeneity and independence of variance were checked before analysis. Non parametric tests (Kruskal-Wallis tests) were performed to determine differences in all the technological properties analyzed between bacterial genera and between bacteria isolated from human milk or other sources. Level of significance was set at $P < 0.05$. These analyses were performed using Statgraphics Centurion XVI version 16.1.18 (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA).

Principal component analysis (PCA) was performed on the data obtained from the acidifying and proteolytic activities on milk after 24 h in milk and the peptidase and esterase activities found on artificial substrates to explain the variation obtained in the whole data set. Agglomerative hierarchical clustering of the technological properties and bacterial isolates was done using *agnes* function from package *cluster* with the flexible method. Then, a heat map representing the values of all technological properties of the bacterial strains was plotted. PCA and cluster analysis were performed using R 2.15.3 (R-project, <http://www.r-project.org>).

III.4. RESULTS

III.4.1. Acidifying activities

The acidifying activities of the strains tested in this study are shown in Figure 1. After 6 h in HT-RSM, the highest acid producing ability among the bacteria isolated from human milk corresponded to *E. faecalis* SC8 and *E. faecalis* SC1 (pH 5.82 for both strains, and 0.12 ± 0.01 and 0.10 ± 0.01 g of lactic acid/100 mL of milk, respectively), followed by *L. fermentum* CECT 5716 and *Lactobacillus gastricus* ZL90-2 (0.10 ± 0.01 g of lactic acid/100 mL of milk) and *L. gastricus* ZL66-25 (0.11 ± 0.00 g of lactic acid/100 mL of milk) (Figure 1). Two strains originally isolated from cheese, *Enterococcus durans* AZ6 and *Lc. lactis* ESI 153, were used as controls and generated twice the amount of lactic acid (0.20 ± 0.01 and 0.19 ± 0.01 g of lactic acid/100 mL of milk, respectively). *B. breve* 26M2, *B. breve* 29M2, *L. gastricus* ZL74-21, *Streptococcus mitis* ZL38-12, *S. mitis* ZL62-14, *S. mitis* ZL97-12, *Streptococcus salivarius* ZL25-2, and *S. salivarius* ZL94-21 were the strains displaying the lowest acidifying activity and, in fact, they did not change the pH of HT-RSM (Figure 1).

After 24h in HT-RSM, most of the strains acidified HT-RSM albeit to a varying degree. However, *L. gastricus* ZL74-21 and *L. gastricus* 78-21, *S. mitis* ZL38-12, *S. mitis* ZL62-14 and *B. breve* 26M2 failed to produce acid in these conditions; similar behavior was observed for some potentially probiotic strains such as *Lactobacillus acidophilus* CECT 903^T, *L. fermentum* CECT 285 and *L. rhamnosus* GG (Figure 1). Globally, among strains isolated from human milk, those belonging to the species *S. salivarius* (3 strains), *E. faecalis* (10 strains) and *Lc. lactis* (1 strain) had the highest acidifying activity (ranging from 0.53 ± 0.00 to 0.23 ± 0.01 g of lactic acid/100 mL of milk, in *S. salivarius* ZL25-2 and *E. faecalis* M12, respectively). However, their acid production was lower compared to strains isolated from cheese (*Lc. lactis* ESI 153 and *E. faecalis* TAB28) and commercial probiotic fermented milk (*Lactobacillus johnsonii* La1 and *Lactobacillus casei* imunitass); the acidifying activity of these strains ranged from 0.81 ± 0.01 to 0.49 ± 0.01 g of lactic acid/100 mL of milk, in *E. faecalis* TAB28 and *L. johnsonii* La1, respectively (Figure 1).

III.4.2. Proteolytic activities

A high variability was also observed in relation to the proteolytic activities determined using the OPA test (Table 1). Among strains isolated from human milk, proteolytic activity could not be detected in a total of 8 strains (25% of human milk isolates; *B. breve* 29M2, *E. faecalis* SC8, *L. gasseri* CECT 5714, *L. gastricus* ZL90-28, *L. gastricus* ZL93-23, *Lc. lactis* ZL114-17, *S. mitis* ZL97-12, and *S. salivarius* ZL25-2). The inability to hydrolyze casein under this assay conditions was more frequent among the strains isolated from other sources (39% of the strains), and it was also observed in strains isolated from dairy products or used as dairy cultures (*E.*

durans AZ6, *L. rhamnosus* GG, *Lc. lactis* ESI 515, *Streptococcus thermophilus* CHCC 2389) (Table 1).

When detected, the proteolytic activity (measured as ΔOD_{340}) of strains from human milk ranged from 0.002 ± 0.000 (*S. mitis* ZL2-17) to 0.421 ± 0.007 (*E. faecalis* VM6) (Table 1). Significantly, *E. faecalis* VM6 had the second highest value for proteolytic activity considering the whole set of bacteria, and its activity was approximately half of the value obtained for *E. faecalis* TAB28 (0.800 ± 0.011). Proteolytic activity was not detected in *L. gasseri* CECT 5714, *L. gastricus* ZL90-28 and *L. gastricus* ZL93-23, while the other lactobacilli strains had intermediate but variable values for proteolytic activity with ΔOD_{340} values ranging from 0.037 ± 0.004 (*L. salivarius* ZL17-16) to 0.109 ± 0.001 (*L. gastricus* ZL66-25). Streptococcal strains isolated from human milk had scarce proteolytic activity (Table 1).

III.4.3. Peptidase activities

Enzymes present in CFE of strains isolated from human milk were able to hydrolyze Ala-*p*NA, Leu-*p*NA, Lys-*p*NA, Pro-*p*NA, and Gly-Pro-*p*NA and the results are shown in Figure 2 and Table 2. Globally, the lowest activities corresponded to Pro-*p*NA. In particular, *S. salivarius* ZL49-18 exhibited the most intense peptidase activities (18.84 ± 1.24 , 20.10 ± 2.58 , 34.66 ± 0.23 , 0.82 ± 0.33 , and 20.42 ± 0.17 nmol *p*NA mg^{-1} prot h^{-1} for Ala-*p*NA, Leu-*p*NA, Lys-*p*NA, Pro-*p*NA, and Gly-Pro-*p*NA, respectively) among all strains isolated from human milk and they were comparable, except for the activity on Pro-*p*NA, to those of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32, a strain used commercially as an adjunct culture in cheesemaking. Among lactobacilli, *L. salivarius* ZL17-16, *L. salivarius* ZL26-21 and *L. salivarius* PS2 showed high activity with some of the substrates assayed.

III.4.4. Esterase activities

Regarding esterase activities of human milk isolates, *S. salivarius* strains displayed the highest activities on α NA derivatives of acetate, propionate, butyrate, and caproate (Figure 3). Among all the strains assayed in this study, the highest values of esterase activities on any substrate assayed were recorded for *S. salivarius* ZL49-18 (11.85 ± 1.00 , 21.11 ± 1.41 , 15.95 ± 0.67 , and 11.28 ± 0.34 $\mu\text{mol } \alpha\text{NA } \text{mg}^{-1}$ prot h^{-1} for $\alpha\text{NA-C2}$, $\alpha\text{NA-C3}$, $\alpha\text{NA-C4}$, and $\alpha\text{NA-C6}$, respectively). In the *Lactobacillus* group, *L. gastricus* strains were the most active and their preferred substrates were propionate, butyrate, and caproate, while *L. salivarius* strains preferred acetate (Figure 3). Neither *Bifidobacterium* nor *Enterococcus* strains displayed significant activities in any of the substrates assayed, except *E. faecalis* VM6 that hydrolyzed efficiently αNA -butyrate (Figure 3).

III.4.5. Global analysis of technological properties

High variability in acid production, proteolysis, peptidase and esterase activities was observed among all the bacteria analyzed. Statistical differences were found in the values of technological properties between the different bacterial genera (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) but not between strains isolated from human milk and those from other sources; no interactions were observed between both factors (taxonomic groups and isolation source) (Table 3). Strains of *Lactococcus*, *Streptococcus* and *Enterococcus* had the highest acid producing ability after 24 h in milk, while *Enterococcus* exhibited the most remarkable proteolytic activities (Table 2). Regarding peptidase and esterase activities, streptococci were the most active on all the assayed substrates except on Pro-*p*NA; this substrate was readily hydrolyzed by *B. bifidum* CECT 870 (Table 3 and Figure 2).

Principal component analysis (PCA) was performed on acid production, proteolysis and peptidase and esterase activities. The first two components explained 49.8% of the variance and showed a *P* value of 0.017 after 199 permutations when ANOVA test of the model was performed (Figure 4). Both the first and second components were associated with variables related to proteolytic activity, mainly those activities targeting milk proteins (proteolysis), Leu-, Lys-, and Gly-Pro-*p*NA, as shown by the principal component loadings (Figure 4). The PCA revealed groups corresponding to bacterial genera, but no defined groups could be identified on the basis of the source (human milk or other source).

To identify groups of strains with different patterns of technological properties an agglomerative hierarchical cluster analysis was carried out; the agglomerative coefficient for the strains was 0.91, and for technological properties its value was 0.57 (Figure 5). Four bifidobacterial strains formed a cluster on the basis of high aminopeptidase on proline. Members of lactobacilli were found in a high number of clusters together with isolates from other bacterial genera. The two most distant branches of the dendrogram contained only two members (one isolate was from human milk and the other from dairy origin): *S. salivarius* ZL49-18 and *L. helveticus* CNRZ32, in one cluster, and *E. faecalis* VM6 and *E. faecalis* TAB28, in the other. Bacterial strains isolated from human milk and those isolated from other sources were distributed throughout the dendrogram (Figure 5).

III.5. DISCUSSION

Some technological relevant properties of bacteria isolated from human milk and other sources, including other human locations (gastrointestinal tract, oral cavity) and dairy industry (fermented milk products, starter and adjunct cultures), were tested and compared to get preliminary information that would allow the selection of human milk strains for application in the dairy industry.

Notable intra- and interspecific variation in the technological properties (acidification, proteolysis and peptidase and esterase activities) analyzed in this work was registered among the human milk bacteria. It is common to observe a high interspecies variability when studying technological properties in “wild” strains such as those isolated from raw milk and artisan cheese. Actually, these sources have been repeatedly explored to isolate bacteria displaying novel properties that would allow the development of new starter, adjunct or, even, probiotic cultures for the dairy industry (Ayad *et al.*, 1999; Bozoudi *et al.*, 2015; Cogan *et al.*, 1997; Piraino *et al.*, 2008). This is considered to be a good option for improving industrial fermented dairy products which are often manufactured with pasteurized milk and standardized commercial starter cultures and, therefore, usually display mild sensory characteristics (Van Hoorde *et al.*, 2010).

The primary function of starter LAB in dairy fermented products is to produce high amounts of lactic acid that will lead to milk acidification provoking textural changes in milk and inhibiting the growth of spoilage microorganisms (Beresford and William, 2003). Therefore, the fast production of acid and high proteolytic activity to allow adequate growth in milk are usually considered the main selection criteria for starter cultures in dairy industry (Cogan *et al.*, 1997). In general, low acid production was found among strains isolated from human milk in this study. Actually, good acidifying activity is an infrequent trait among lactococci isolated from artisan dairy products (Cogan *et al.*, 1997). However, the ability of *S. salivarius* to produce acid at 30°C at rates comparable with *S. thermophilus* may be of interest for starter cultures.

LAB displaying low acidifying and proteolytic activities may be useful as adjunct cultures in dairy industry (Crow *et al.*, 2001; Georgieva *et al.*, 2009). Secondary microbiota involved in dairy fermentations, known as non-starter LAB, do not contribute to acid production during manufacture, and may even not grow well in milk, but play an important role in the ripening of fermented dairy products (Settanni and Moschetti, 2010). The secondary proteolysis, after the rennet action, mainly due to non-starter LAB peptidases liberates small peptides and free amino acids, which are the major precursors of specific flavour compounds (Briggiler-Marco *et al.*, 2007; Lynch *et al.*, 1999). Lactobacilli strains with low proteinase activity have been successfully applied as adjunct cultures in different types of cheeses because of their peptidase potential (Van Hoorde *et al.*, 2010). Adjunct cultures may promote product

differentiation, specifically in short-ripened products, and meet the sensory requirements of particular segments of consumers due to increased proteolytic activity that potentiates flavor development (Braghieri *et al.*, 2015).

Globally, *S. salivarius* and *L. salivarius* strains isolated from human milk displayed high peptidase and esterase activities on most substrates that were assayed. Singular peptidase activities detected in human milk *L. salivarius* strains may have interest if used as adjunct culture. The hydrolysis of Gly-Pro-pNA is related to X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase (XPDAP) activity which releases X-Pro dipeptides from oligopeptides and reduces bitterness in dairy products (Barry *et al.*, 2001). *L. salivarius* ZL26-21 cleaved Gly-Pro-pNA with equal efficiency to *L. helveticus* CNRZ32, a commercial cheese flavor adjunct that reduces bitterness and intensifies flavor notes (Christiansen *et al.*, 2008). The proteolytic complex of *L. helveticus* CNRZ32, that is auxotrophic for 14 aminoacids, is highly complex and comprises an extracellular cell envelope-associated proteinase, specialized transport systems for peptides and a wide array of intracellular endo- and exopeptidases to liberate aminoacids (Broadbent *et al.*, 2011). This highly complex proteolytic system is also related to the production of bioactive peptides formed during fermentation of dairy products (Griffiths and Tellez, 2013). Further investigation is necessary to elucidate the role of selected *S. salivarius* and *L. salivarius* strains isolated from human milk in the development of flavor and bioactive peptides.

S. salivarius is a relevant member of the oral microbiota and it is considered one of the first colonizers of human oral mucosa (Chen and Jiang, 2014). This species has also been isolated from human colostrum and milk (Jiménez *et al.*, 2008; Martín *et al.*, 2010), which may explain why it is detected from 8 hours after birth in the mouth of breastfeed infants (Rotini *et al.*, 1981). *S. salivarius* is also frequently found in the small intestine microbiota, where participates actively in the carbohydrate metabolism that takes place there (van der Bogert *et al.*, 2013). An expanded repertoire of health-promoting applications, including but not limited to oral health, has been described for several *S. salivarius* strains (Burton *et al.*, 2006; Wescombe *et al.*, 2012). *S. salivarius* is closely related to *S. thermophilus*, which is not a natural inhabitant of the human mucosae but it is frequently found on the mammary mucosa of bovines and is a common member of starter cultures used in the production of fermented milks and some cooked-type cheeses (Pombert *et al.*, 2009).

Only small differences have been found between dairy- and human-associated species of *Lactobacillus*, generally related to deletions, nonsense mutations and truncations in not relevant genes for a specific environment (Callanan *et al.*, 2008). Recently, a 9 gene “barcode” to identify niche specific genes included components of the proteolytic system that were unique to isolates from dairy environment (O'Sullivan *et al.*, 2008). PCA analysis has been carried out on data sets to summarize the diversity of properties of several LAB isolated from dairy products (Giraffa *et al.*, 2004; Piraino

et al., 2008). The results obtained in this work, that was limited to a reduced number of dairy technological properties, revealed some variability among on dairy technological properties of the strains including their peptidase activity. However, the observed differences were associated to taxonomic groups rather than to the source (human milk vs. other sources) of the bacteria.

Initial characterization of several basic technological properties in bacterial species usually not related to the dairy industry could be of interest to explore its potential to develop novel functional foods or, alternatively, discover distinct starter or adjunct cultures for dairy fermentations. This is the case of some human strains of *S. salivarius* and *L. salivarius* such as those assayed in this study. Strains of *L. salivarius*, similarly to *S. salivarius*, are common in the human gastrointestinal tract and good probiotic candidates but they are not usually found in fermented foods (Raftis *et al.*, 2011; van den Bogert *et al.*, 2013; Walter, 2008). The relevant proteinase and esterase activities of human strains belonging to both species may encourage studying their impact as adjunct cultures to improve the flavor of fermented dairy products.

Acknowledgements

Lc. lactis ESI 153 and *Lc. lactis* ESI 515 were kindly provided by Dra. Margarita Medina (Departamento de Tecnología de los Alimentos, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria). We would like to thank Dr. Irene Espinosa for assistance with statistical analysis.

III.6. REFERENCES

- Abeijón, M.C., Medina, R.B., Katz, M.B., González, S.N. 2006. Technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from ewe's milk and cheese with importance for flavour development. *Can J Microbiol.* 52:237-245.
- Arbolea, S., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Solís, G., Salminen, S., de Los Reyes-Gavilán, C.G., Gueimonde, M. 2011. Characterization and *in vitro* properties of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-milk. *Int J Food Microbiol.* 149:28-36.
- Aureli, P., Capurso, L., Castellazzi, A.M., Clerici, M., Giovannini, M., Morelli, L., Poli, A., Pregliasco, F., Salvini, F., Zuccotti, G.V. 2011. Probiotics and health: an evidence-based review. *Pharmacol Res.* 63:366-376.
- Ayad, E.H.E., Verheul, A., de Jong, C., Wouters, J.T.M., Smit, G. 1999. Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. *Int Dairy J.* 9:725-735.
- Beresford, T., Williams, A. 2004. The microbiology of cheese ripening. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol 1. Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (eds.). Academic Press, p:287-317.
- Bozoudia, D., Kotzamanidisc, Ch., Hatzikamaria, M., Tzanetakisa, N., Menexesb, G., Litopoulou-Tzanetakia, E. 2015. A comparison for acid production, proteolysis, autolysis and inhibitory properties of lactic acid bacteria from fresh and mature Feta PDO Greek cheese, made at three different mountainous areas. *Int J Food Microbiol.* 200:87-96.
- Broadbent, J.R., Cai, H., Larsen, R.L., Hughes, J.E., Welker, D.L., De Carvalho, V.G., Tompkins, T.A., Ardö, Y., Vogensen, F., De Lorentiis, A., Gatti, M., Neviani, E., Steele, J.L. 2011. Genetic diversity in proteolytic enzymes and amino acid metabolism among *Lactobacillus helveticus* strains. *J Dairy Sci.* 94:4313-4328.
- Burton, J.P., Wescombe, P.A., Moore, C.J., Chilcott, C.N., Tagg, J.R. 2006. Safety assessment of the oral cavity probiotic *Streptococcus salivarius* K12. *Environ Microbiol Rep.* 72:3050-3053.
- Carr, F.J., Chill, D., Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev Microbiol.* 28:281-370.
- Chen, H., Jiang, W. 2014. Application of high-throughput sequencing in understanding human oral microbiome related with health and disease. *Front Microbiol.* 5:508.
- Christiansen, J.K., Hughes, J.E., Welker, D.L., Rodríguez, B.T., Steele, J.L., Broadbent, J.R. 2008. Phenotypic and genotypic analysis of amino acid auxotrophy in *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32. *Appl Environ Microbiol.* 74:416-23.
- Church, F.C., Porter, D.H., Catignani, G.L., Swaisgood, H.E. 1985. An o-phthalaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. *Anal Biochem.* 146:343-348.
- Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P.S., Fernandes, I., Gomez, M.J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina,

- M., Rea, M.C., Rodriguez, E. 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J Dairy Res.* 64:409-421.
- Crow, V.L., Curry, B., Hayes, M. 2001. The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. *Int Dairy J.* 11:275-283.
- Doyle, M.P., Steenson, L.R., Meng, J. 2013. Bacteria in food and beverage production. Chapter 8. In *The Prokaryotes-Applied Bacteriology and Biotechnology*. Rosenberg *et al.* (eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p: 241-256.
- Douillard, F.P., de Vos, W.M. 2014. Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. *Microb Cell Fact.* 13:S8.
- Elsser-Gravesen, D., Elsser-Gravesen, A. 2014. Biopreservatives. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 143:29-49.
- Fellis, G.E., Dellaglio, F. 2007. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr Issues Intestinal Microbiol.* 8:44-61.
- Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Muñoz-Quesada, S., Gil, A. 2013. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British J Nutr.* 109:S35-S50.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L., Ben Omar N. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol.* 120:51-70.
- Georgieva, R., Iliev, I., Haertlé, T., Chobert, J-M., Ivanova, I., Danova, S. 2009. Technological properties of candidate probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Int Dairy J.* 19:696-702.
- Giraffa, G., Andrighetto, C., Antonello, C., Gatti, M., Lazzi, C., Marazzan, G., Lombardi, A., Neviani, E. 2004. Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* strains of dairy origin. *Int J Food Microbiol.* 91:129-39.
- Griffiths, M.W., Tellez, A.M. 2013. *Lactobacillus helveticus*: the proteolytic system. *Front Microbiol.* 5:4:30.
- Heikkilä, M.P., Saris, P.E.J. 2003. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol.* 95:471-478.
- Jiménez, E., Delgado, S., Fernández, L., García, N., Albújar, M., Gómez, A., Rodríguez, J.M. 2008. Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of staphylococcal and enterococcal populations for potential virulence factors. *Res Microbiol.* 159:595-601.
- Lynch, C.M., Muir, D.D., Banks, J.M., McSweeney, P.L.H., Fox, P.F. 1999. Influence of adjunct cultures of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* or *Lactobacillus plantarum* on Cheddar cheese ripening. *J Dairy Sci.* 82:1618-1628.
- Leroy, F., de Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci Technol.* 15:67-78.
- Marín, M.L., Arroyo, R., Jiménez, E., Gómez, A., Fernández, L., Rodríguez, J.M. 2009. Cold storage of human milk: effect on its bacterial composition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 49:343-8.

- Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M.L., Xaus, J., Fernández, L., Rodríguez, J.M. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *Journal Pediatr.* 143:754-758.
- Martín, R., Olivares, M., Marín, M.L., Fernández, L., Xaus, J., Rodríguez, J.M. 2005. Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. *J Hum Lact.* 21:8-17.
- Martín, R., Jiménez, E., Olivares, M., Marín, M.L., Fernández, L., Xaus, J., Rodríguez, J.M. 2006. *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. *Int J Food Microbiol.* 112:35-43.
- Martín, R., Jiménez, E., Heilig, H., Fernández, L., Marín, M.L., Zoetendal, E.G., Rodríguez, J. M. 2009. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Appl Environ Microbiol.* 75:965-969.
- Martín, V., Maldonado, A., Fernández, L., Rodríguez, J.M., Connor, R.I. 2010. Inhibition of HIV-1 by lactic acid bacteria from human breast milk. *Breastfeed Med.* 5:153-158.
- Martin, V. 2011. Interacciones entre la microbiota de la leche humana y el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) [Interactions between the microbiota of human milk and the type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1)]. Ph D Dissertation. Universidad Complutense de Madrid, Spain.
- Martín, V., Maldonado-Barragán, A., Moles, L., Rodríguez-Baños, M., Campo, R.D., Fernández, L., Rodríguez, J.M., Jiménez, E. 2012. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *J Hum Lact.* 28:36-44.
- Moll, G.N., Konings, W.N., Driessen, A.J.M. 1999. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek.* 76:185-198.
- Neville, B.A., O'Toole, P.W. 2010. Probiotic properties of *Lactobacillus salivarius* and closely related *Lactobacillus* species. *Future Microbiol.* 5:759-774.
- O'Sullivan, O., O'Callaghan, J., Sangrador-Vegas, A., McAuliffe, O., Slattery, L., Kaleta, P., Callanan, M., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P., Beresford, T. 2009. Comparative genomics of lactic acid bacteria reveals a niche-specific gene set. *BMC Microbiol.* 9:50.
- Piraino, P., Zotta, T., Ricciardia, A., McSweeney, P.L.H., Parente, E. 2008. Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from pasta filata cheeses: a multivariate screening study. *Int Dairy J.* 18:81-92.
- Pombert, J-F, Sisteck, V., Boissinot, M, Frenette, M. 2009. Evolutionary relationships among salivarius streptococci as inferred from multilocus phylogenies based on 16S rRNA-encoding, *recA*, *secA*, and *secY* gene sequences. *BMC Microbiol.* 9:232.
- Raftis, E.M., Salvetti, E., Torriani, S., Giovanna E. Felis, G.E., O'Toole P.W. 2011. Genomic diversity of *Lactobacillus salivarius*. *Appl Environ Microbiol.* 77:954-965.

- Reginensi, S.M., González, M.J., Bermúdez, J. 2013. Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from cow, ewe and goat dairy artisanal farmhouses. *Braz J Microbiol.* 44:427-430.
- Rodríguez, E., González, B., Gaya, P., Nuñez, M., Medina, M. 2000. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *Int Dairy J.* 10:7-15.
- Rotimi, V.O., Duerden, B.I. 1981. The development of the bacterial flora in normal neonates. *J Med Microbiol.* 14:51-62.
- Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M.D., Rea, M.C., Lombardi, A., Cogan, T.M., Kalantzopoulos, G. Tsakalidou, E. 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *Int Dairy J.* 11:621-647.
- Settanni, L., Moschetti, G. 2010. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiol.* 27:691-697.
- Shiby VK, Mishra HN. 2013. Fermented milks and milk products as functional foods-- a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 53:482-496.
- Stiles, M.E., Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol.* 36:1-29.
- Van Hoorde, K., Van Leuven, I., Dirinck, P., Heyndrickx, M., Coudijzer, K., Vandamme, P., Huys, G. 2010. Selection, application and monitoring of *Lactobacillus paracasei* strains as adjunct cultures in the production of Gouda-type cheeses. *Int J Food Microbiol.* 144:226-235.
- van den Bogert, B., Erkus, O., Boekhorst, J., de Goffau, M., Smid, E.J., Zoetendal, E.G., Kleerebezem, M. 2013. Diversity of human small intestinal *Streptococcus* and *Veillonella* populations. *FEMS Microbiol Ecol.* 85:376-388.
- Wescombe, P.A., Hale, J.D., Heng, N.C, Tagg, J.R. 2012. Developing oral probiotics from *Streptococcus salivarius*. *Future Microbiol.* 7:1355-71.

Table 1. Origin and proteolytic activity of LAB and bifidobacteria isolated from human milk and comparison to that of strains from other sources. Proteolytic activity was assayed in HT-RMS (10% w/v) after 24 h at 30°C.

Strain	Origin (reference)*	Proteolytic activity (ΔOD_{340})
<i>Lactococcus</i>		
<i>Lc. lactis</i> ZL114-17	Human milk (1)	ND**
<i>Lc. lactis</i> ESI 153	Cheese (2)	0.111 ± 0.008
<i>Lc. lactis</i> ESI 515	Cheese (2)	ND
<i>Streptococcus</i>		
<i>S. mitis</i> ZL2-17	Human milk (1)	0.002 ± 0.000
<i>S. mitis</i> ZL38-12	Human milk (1)	0.015 ± 0.003
<i>S. mitis</i> ZL62-14	Human milk (1)	0.017 ± 0.000
<i>S. mitis</i> ZL97-12	Human milk (1)	ND
<i>S. salivarius</i> ZL25-2	Human milk (1)	ND
<i>S. salivarius</i> ZL49-18	Human milk (1)	0.009 ± 0.003
<i>S. salivarius</i> ZL94-21	Human milk (1)	0.022 ± 0.004
<i>S. thermophilus</i> CHCC 2389	Dairy starter (3)	ND
<i>S. thermophilus</i> ATCC 19987	Cheese starter (4)	0.024 ± 0.008
<i>Enterococcus</i>		
<i>E. durans</i> AZ6	Cheese (5)	ND
<i>E. faecalis</i> LM1	Human milk (6)	0.090 ± 0.006
<i>E. faecalis</i> LM4	Human milk (6)	0.200 ± 0.001
<i>E. faecalis</i> LM14a	Human milk (6)	0.197 ± 0.001
<i>E. faecalis</i> LM24	Human milk (6)	0.255 ± 0.013
<i>E. faecalis</i> LM31	Human milk (6)	0.178 ± 0.004
<i>E. faecalis</i> M12	Human milk (6)	0.228 ± 0.004
<i>E. faecalis</i> M22	Human milk (6)	0.338 ± 0.005
<i>E. faecalis</i> SC1	Human milk (5)	0.019 ± 0.002
<i>E. faecalis</i> SC8	Human milk (5)	ND
<i>E. faecalis</i> VM6	Human milk (5)	0.421 ± 0.007
<i>E. faecalis</i> TAB28	Cow milk (7)	0.800 ± 0.011
<i>E. faecalis</i> TAB52	Cow milk (7)	0.050 ± 0.000
<i>Lactobacillus</i>		
<i>L. acidophilus</i> CECT 903	Human (8)	ND
<i>L. casei</i> imunitass	Commercial probiotic (5)	0.049 ± 0.001
<i>L. coryniformis</i> CECT 5711	Cheese (9)	0.079 ± 0.008
<i>L. delbrueckii subsp. lactis</i> CECT 282	Unknown (8)	ND
<i>L. fermentum</i> CECT 5716	Human milk (6)	0.070 ± 0.005
<i>L. fermentum</i> CECT 285	Human mouth (8)	ND
<i>L. gasseri</i> CECT 5714	Human milk (6)	ND
<i>L. gastricus</i> ZL35-21	Human milk (10)	0.060 ± 0.010

Table 1. Cont.

Strain	Origin (reference)*	Proteolytic activity (ΔOD_{340})
<i>Lactobacillus</i> (cont.)		
<i>L. gastricus</i> ZL66-25	Human milk (10)	0.109 ± 0.001
<i>L. gastricus</i> ZL74-21	Human milk (10)	0.069 ± 0.002
<i>L. gastricus</i> ZL78-21	Human milk (10)	0.048 ± 0.000
<i>L. gastricus</i> ZL90-28	Human milk (10)	ND
<i>L. gastricus</i> ZL93-23	Human milk (10)	ND
<i>L. gastricus</i> DSM 16045 ^T	Human stomach mucosa (11)	0.110 ± 0.001
<i>L. helveticus</i> CNRZ32	Cheese adjunct culture (12)	0.088 ± 0.004
<i>L. johnsonii</i> La1	Commercial probiotic (5)	0.082 ± 0.004
<i>L. paracasei</i> CECT 4583	Commercial probiotic (8)	ND
<i>L. reuteri</i> CECT 925	Human adult intestine (8)	0.073 ± 0.004
<i>L. rhamnosus</i> GG	Commercial probiotic (5)	ND
<i>L. salivarius</i> CECT 5713	Human milk (6)	0.069 ± 0.005
<i>L. salivarius</i> PS2	Human milk (1)	0.073 ± 0.004
<i>L. salivarius</i> ZL17-16	Human milk (10)	0.037 ± 0.004
<i>L. salivarius</i> ZL26-21	Human milk (10)	0.058 ± 0.000
<i>L. salivarius</i> CECT 4063	Human saliva (8)	ND
<i>L. salivarius</i> CECT 2197	Chicken crop, probiotic (8)	0.039 ± 0.001
<i>Bifidobacterium</i>		
<i>B. bifidum</i> CECT 870	Infant feces (8)	ND
<i>B. breve</i> 26M2	Human milk (13)	0.032 ± 0.004
<i>B. breve</i> 29M2	Human milk (13)	ND
<i>B. breve</i> CECT 4839	Infant feces (8)	0.113 ± 0.030
<i>B. infantis</i> CECT 4551	Infant intestine (8)	0.060 ± 0.001

*References: (1) Martín (2011); (2) Cogan *et al.* (1997); (3) CHCC, Christian Hansen Culture Collection; (4) ATCC, American Type Culture Collection; (5) laboratory collection; (6) Martín *et al.* (2003); (7) Rodríguez *et al.* (2000); (8) CECT, Spanish Type Culture Collection; (9) Martín *et al.* (2005); (10) Martín *et al.* (2012); (11) DMSZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures; (12) CNRZ, Centre National de Recherche Zootechnique Collection (13) Marín *et al.* (2009).

**ND, not detectable.

Table 2. Mean (range) values of technological properties of bacterial strains isolated from human milk.

	<i>Lactococcus</i> ^a (n = 1)	<i>Streptococcus</i> ^b (n = 7)	<i>Enterococcus</i> ^b (n = 10)	<i>Lactobacillus</i> ^d (n = 12)	<i>Bifidobacterium</i> ^e (n = 2)	<i>p</i> ^f
Acidification						
Acid production (g 100 mL ⁻¹)	0.34	0.27	0.26	0.15	0.13	0.013
	-	(0.02-0.52)	(0.23-0.30)	(0.04-0.23)	(0.04-0.22)	
pH (at 24 h)	5.61	5.52	5.51	5.93	6.82	0.051
	-	(4.74-6.53)	(5.39-5.63)	(5.51-6.50)	(5.48-6.16)	
Proteinase and aminopeptidase activity on:						
Milk proteins	ND	0.009	0.193	0.050	0.016	0.007
(ΔOD ₃₄₀)		(0.000-0.022)	(0.000-0.421)	(0.000-0.109)	(0.000-0.032)	
Ala- <i>p</i> NA	0.12	5.79	4.62	2.87	0.38	0.343
(nmol mg ⁻¹ h ⁻¹)	-	(0.06-18.84)	(0.21-20.04)	(0.00-12.09)	-	
Leu- <i>p</i> NA	0.02	7.00	1.19	3.34	1.92	0.067
(nmol mg ⁻¹ h ⁻¹)	-	(0.56-18.67)	(0.26-3.82)	(0.17-15.59)	-	
Lys- <i>p</i> NA	1.23	11.12	5.60	4.85	2.25	0.960
(nmol mg ⁻¹ h ⁻¹)	-	(0.10-34.07)	(0.22-18.85)	(0.00-26.93)	(0.55-3.94)	
Pro- <i>p</i> NA	0.05	0.41	2.02	1.41	5.54	0.061
(nmol mg ⁻¹ h ⁻¹)	-	(0.06-0.78)	(0.06-13.92)	(0.00-12.87)	-	
Gly-Pro- <i>p</i> NA	0.03	9.68	0.76	4.31	2.92	0.041
(nmol mg ⁻¹ h ⁻¹)	-	(0.17-27.70)	(0.05-3.02)	(0.00-23.98)	-	
Esterase activity on:						
αNA-C2	0.02	5.93	1.05	1.84	0.50	0.042
(μmol mg ⁻¹ h ⁻¹)	-	(0.58-11.85)	(0.03-4.40)	(0.02-10.49)	-	
αNA-C3	0.03	7.49	1.63	2.80	1.73	0.090
(μmol mg ⁻¹ h ⁻¹)	-	(0.31-21.11)	(0.23-3.85)	(0.21-7.32)	-	
αNA-C4	0.34	6.46	2.13	2.64	1.64	0.273
(μmol mg ⁻¹ h ⁻¹)	-	(1.11-15.95)	(0.00-11.78)	(0.02-6.29)	-	
αNA-C6	0.33	2.67	0.65	1.40	1.07	0.114
(μmol mg ⁻¹ h ⁻¹)	-	(0.02-11.28)	(0.00-4.71)	(0.01-3.72)	-	

^a*L. lactis*; ^b*S. mitis* (n=4), *S. salivarius* (n=3); ^c*E. faecalis*; ^d*L. fermentum* (n=1), *L. gasseri* (n=1), *L. gastricus* (n=6), *L. salivarius* (n=3); ^e*B. breve*.

^fKruskal-Wallis tests.

Table 3. Mean (range) values of technological properties in LAB and bifidobacteria strains analyzed in this study

	<i>Lactococcus</i> ^a (n = 3)	<i>Streptococcus</i> ^b (n = 9)	<i>Enterococcus</i> ^c (n = 13)	<i>Lactobacillus</i> ^d (n = 25)	<i>Bifidobacterium</i> ^e (n = 5)	<i>P^f</i>	Human milk (n = 32)	Othersources (n = 23)	<i>P^f</i>
Acidification									
Acidproduction (g 100 mL ⁻¹)	0.40 (0.08-0.77)	0.31 (0.02-0.53)	0.29 (0.17-0.81)	0.16 (0.03-0.77)	0.10 (0.00-0.22)	0.002	0.22 (0.02-0.53)	0.24 (0.00-0.81)	0.326
pH (at 24 h)	5.33 4.22-6.15	5.36 (4.74-6.53)	5.43 (4.57-5.78)	5.89 (4.16-6.50)	6.01 (5.48-6.61)	0.005	5.69 (4.74-6.53)	5.65 (4.16-6.61)	0.418
Proteinase and aminopeptidase activity on:									
Milk proteins (ΔOD_{340})	0.037 (0.000-0.111)	0.010 (0.000-0.024)	0.215 (0.000-0.823)	0.045 (0.000-0.110)	0.041 (0.000-0.113)	0.011	0.082 (0.000-0.421)	0.068 (0.000-0.823)	0.409
Ala-pNA (nmol mg ⁻¹ h ⁻¹)	0.08 (0.04-0.12)	7.73 (0.06-18.84)	4.83 (0.21-20.04)	4.25 (0.00-27.45)	1.21 (0.38-4.16)	0.033	3.85 (0.00-20.04)	5.28 (0.04-27.45)	0.651
Leu-pNA (nmol mg ⁻¹ h ⁻¹)	0.01 (0.01-0.02)	7.31 (0.56-18.67)	1.43 (0.26-4.97)	4.49 (0.17-26.62)	2.60 (1.70-3.82)	0.004	3.28 (0.02-18.67)	4.56 (0.01-26.62)	0.398
Lys-pNA (nmol mg ⁻¹ h ⁻¹)	1.11 (0.85-1.25)	12.15 (0.10-34.07)	5.62 (0.22-18.85)	6.05 (0.00-27.84)	2.72 (0.00-6.29)	0.501	6.18 (0.00-34.07)	6.64 (0.00-27.84)	0.427
Pro-pNA (nmol mg ⁻¹ h ⁻¹)	0.06 (0.04-0.09)	0.49 (0.06-0.79)	1.77 (0.06-13.92)	2.18 (0.00-30.36)	5.03 (1.66-6.64)	0.006	1.60 (0.00-13.92)	2.43 (0.03-30.36)	0.157
Gly-Pro-pNA (nmol mg ⁻¹ h ⁻¹)	2.07 (0.01-6.18)	9.88 (0.17-27.53)	0.77 (0.05-3.02)	4.50 (0.00-35.7)	3.25 (2.50-4.65)	0.014	4.15 (0.00-27.70)	4.39 (0.00-35.70)	0.838
Esterase activity on:									
α NA-C2 (μ mol mg ⁻¹ h ⁻¹)	0.30 (0.01-0.87)	4.87 (0.58-11.27)	1.28 (0.03-4.40)	1.14 (0.02-10.49)	2.82 (0.50-9.83)	0.007	2.35 (0.02-11.85)	1.26 (0.01-9.83)	0.534
α NA-C3 (μ mol mg ⁻¹ h ⁻¹)	0.15 (0.00-0.41)	6.94 (0.31-21.11)	1.78 (0.23-5.94)	1.84 (0.00-7.32)	1.41 (0.00-2.04)	0.006	3.31 (0.03-21.11)	1.44 (0.00-5.94)	0.018
α NA-C4 (μ mol mg ⁻¹ h ⁻¹)	0.37 (0.19-0.58)	6.06 (1.11-15.95)	2.16 (0.00-11.78)	2.35 (0.00-15.71)	1.59 (0.00-2.78)	0.078	3.18 (0.00-15.95)	2.11 (0.00-15.71)	0.054
α NA-C6 (μ mol mg ⁻¹ h ⁻¹)	0.45 (0.26-0.77)	2.59 (0.02-11.28)	0.72 (0.00-4.71)	1.33 (0.00-7.92)	1.02 (0.00-1.99)	0.118	1.39 (0.00-11.28)	1.22 (0.00-7.92)	0.952

^a*L. lactis* (n = 3); ^b*S. mitis* (n = 4), *S. salivarius* (n = 3), *S. thermophilus* (n = 2); ^c*E. durans* (n = 1); *E. faecalis* (n = 12); *L. acidophilus* (n = 1), *L. casei* (n = 1), *L. coryniformis* (n = 1), *L. delbrueckii* (n = 1), *L. fermentum* (n = 2), *L. gasseri* (n = 1), *L. gastricus* (n = 7), *L. helveticus* (n = 1), *L. johnsonii* (n = 1), *L. paracasei* (n = 1), *L. reuteri* (n = 1), *L. rhamnosus* (n = 1), *L. salivarius* (n = 6); ^d*B. bifidum* (n = 1), *B. breve* (n = 3), *B. infantis* (n = 1).

^eKruskal-Wallis tests.

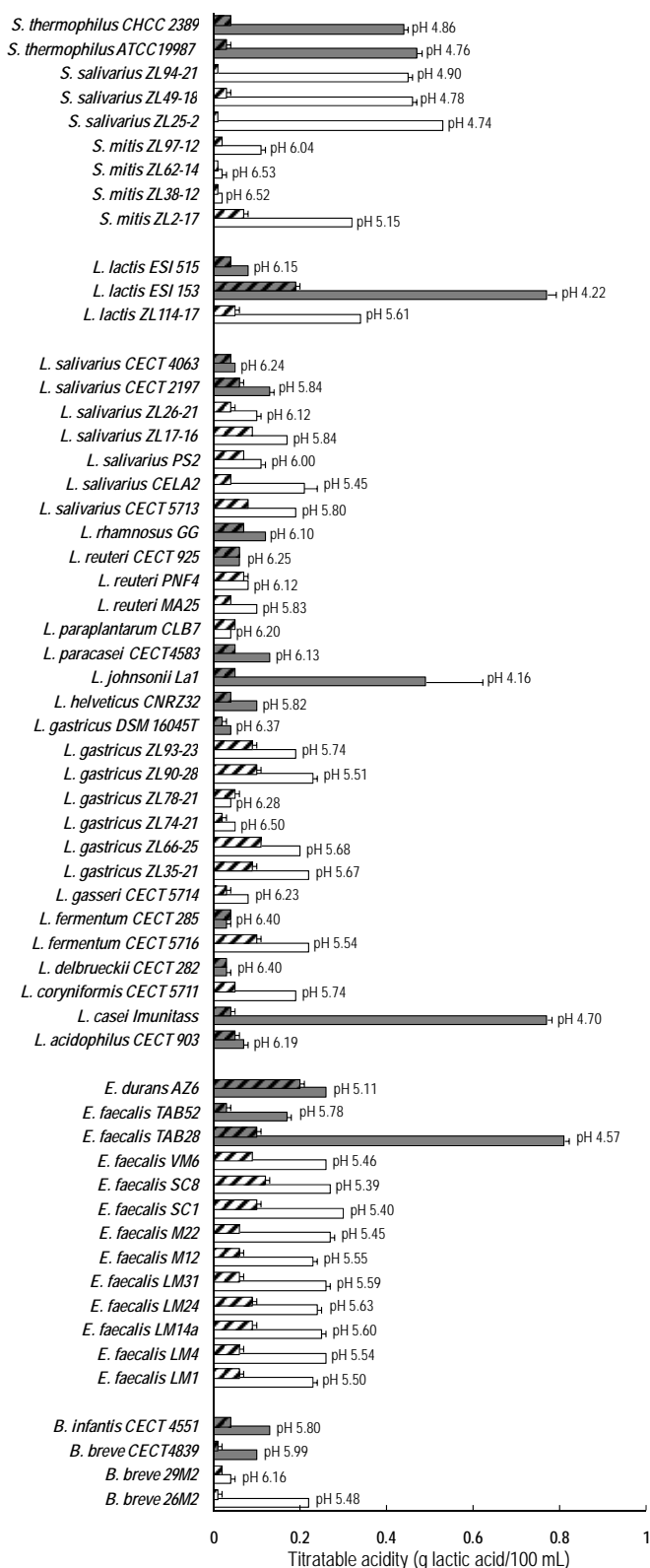


Figure 1. Acidifying activity of bacteria isolated from human milk (white bars) and from other sources (grey bars). Acidifying activity was assayed in HT-RSM (10% w/v; initial pH = 6.6) at 30°C after 6 h (striped bars) and after 24 h (unstriped bars). The pH of the milk after 24 h is shown on the corresponding bar.

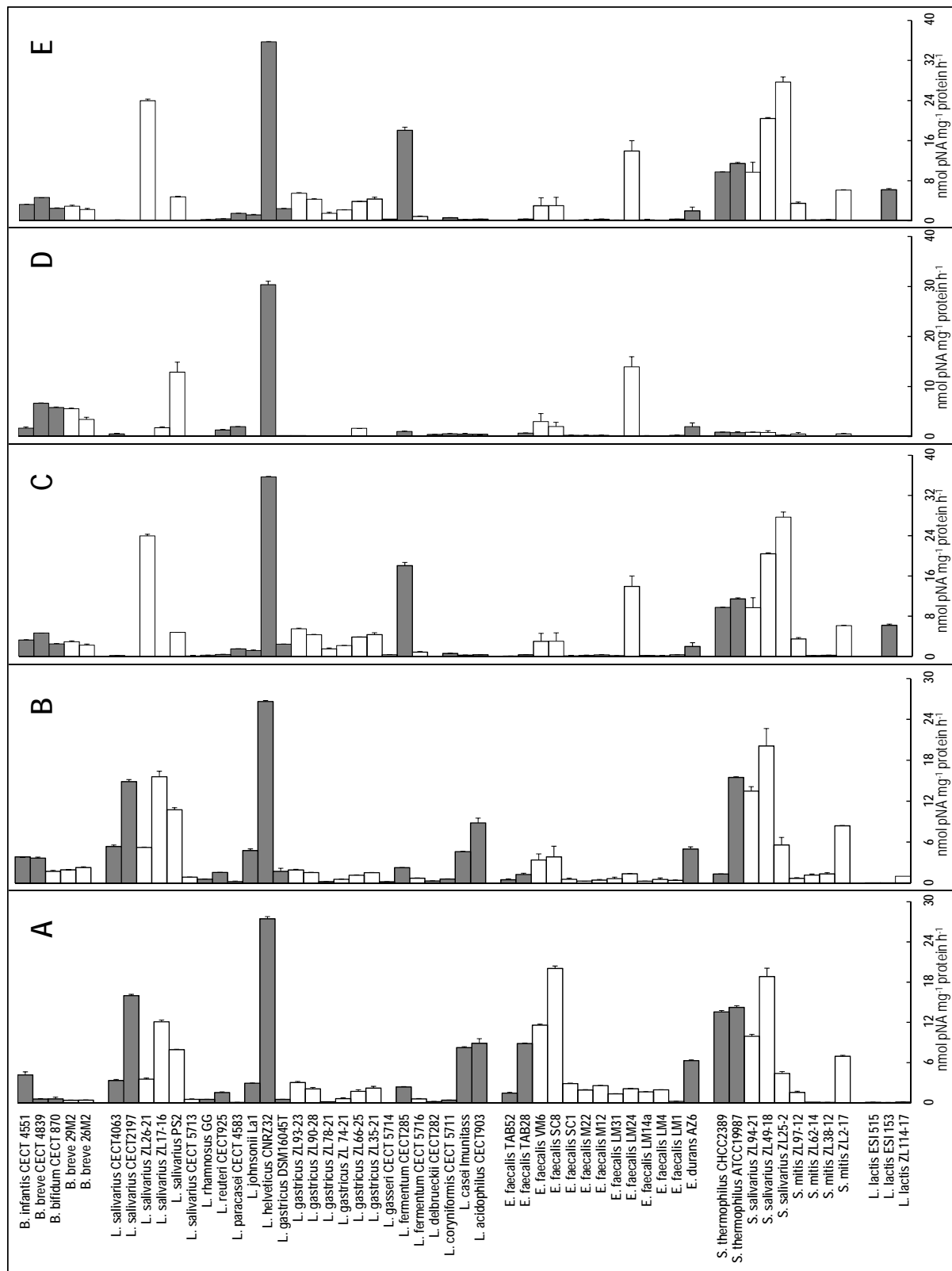


Figure 2. Peptidase activities in CFEs of bacteria isolated from human milk (white bars) and other sources (grey bars) using Ala-pNA (A), Leu-pNA (B), Lys-pNA (C), Pro-pNA (D) or Gly-Pro-pNA (E) as substrates.

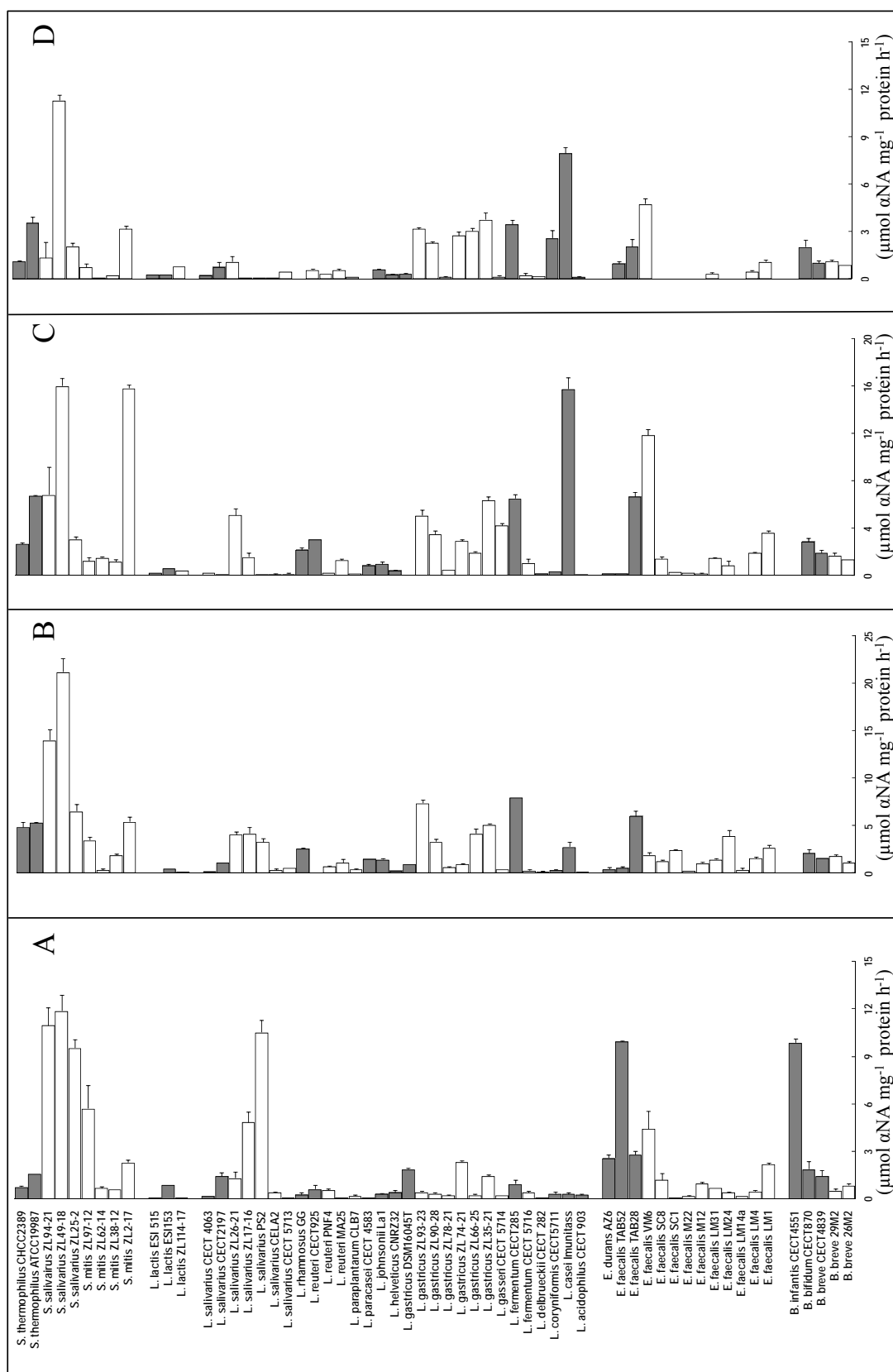


Figure 3. Esterase activities in CFE of bacteria isolated from human milk (white bars) and other sources (grey bars) using $\alpha\text{NA-C2}$ (A), $\alpha\text{NA-C3}$ (B), $\alpha\text{NA-C4}$ (C), or $\alpha\text{NA-C6}$ (D) as substrates.

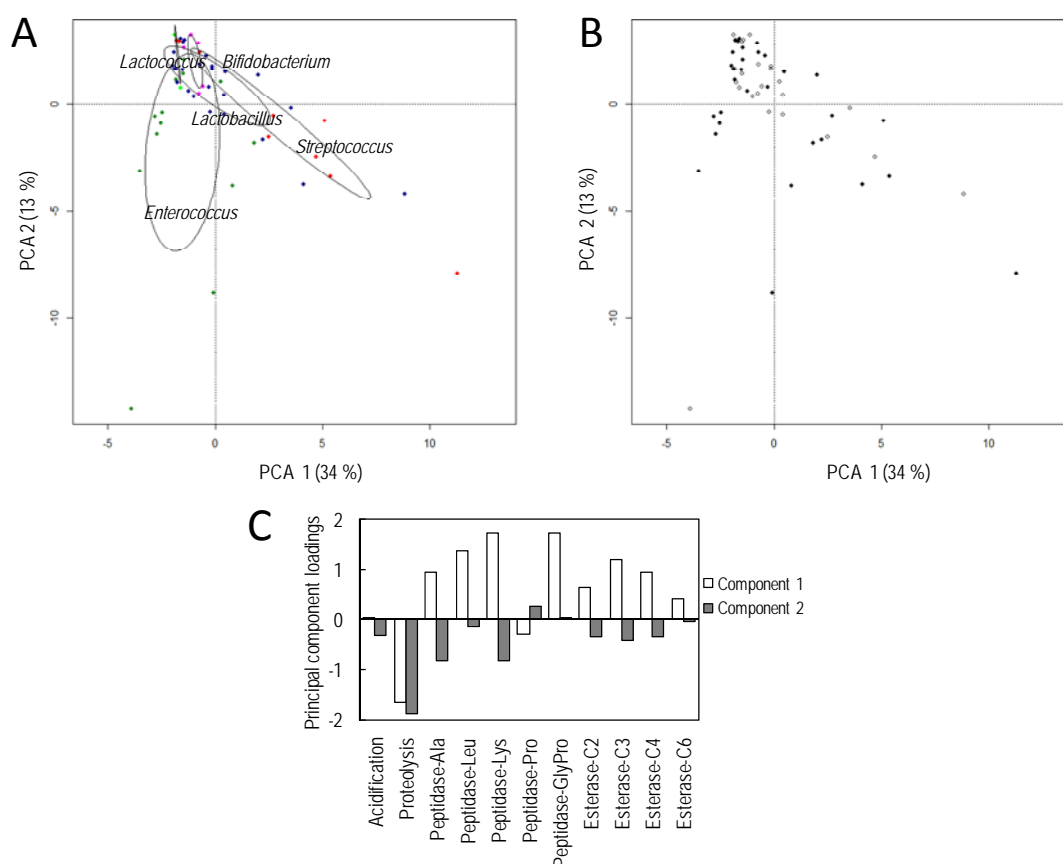


Figure 4. Principal component analysis (PCA) of the technological properties of the bacteria isolated from human milk and other sources. A: Scores of a two-component PCA model showing clustering of strains according to bacterial genera: *Bifidobacterium* (pink), *Enterococcus* (dark green), *Lactococcus* (light green), *Lactobacillus* (blue), and *Streptococcus* (red). The bidimensional PCA plot explains the 50% of the variability and showed a P value of 0.017 after 199 permutations when ANOVA test of the model was performed. B: PCA biplot showing strains according to origin: human milk (light diamonds), other sources (black diamonds). C: Principal component loadings for acidification (expressed as g of lactic acid/L) and proteolysis (expressed as $\times 50\Delta\text{OD}_{340}$) after 24 h in milk and peptidase and esterase activities in CFEs using chromogenic derivatives of alanine (Ala), leucine (Leu), lysine (Lys), proline (Pro), glycine-proline (Gly-Pro), acetate (C2), propionate (C3), butyrate (C4), and caproate (C6).

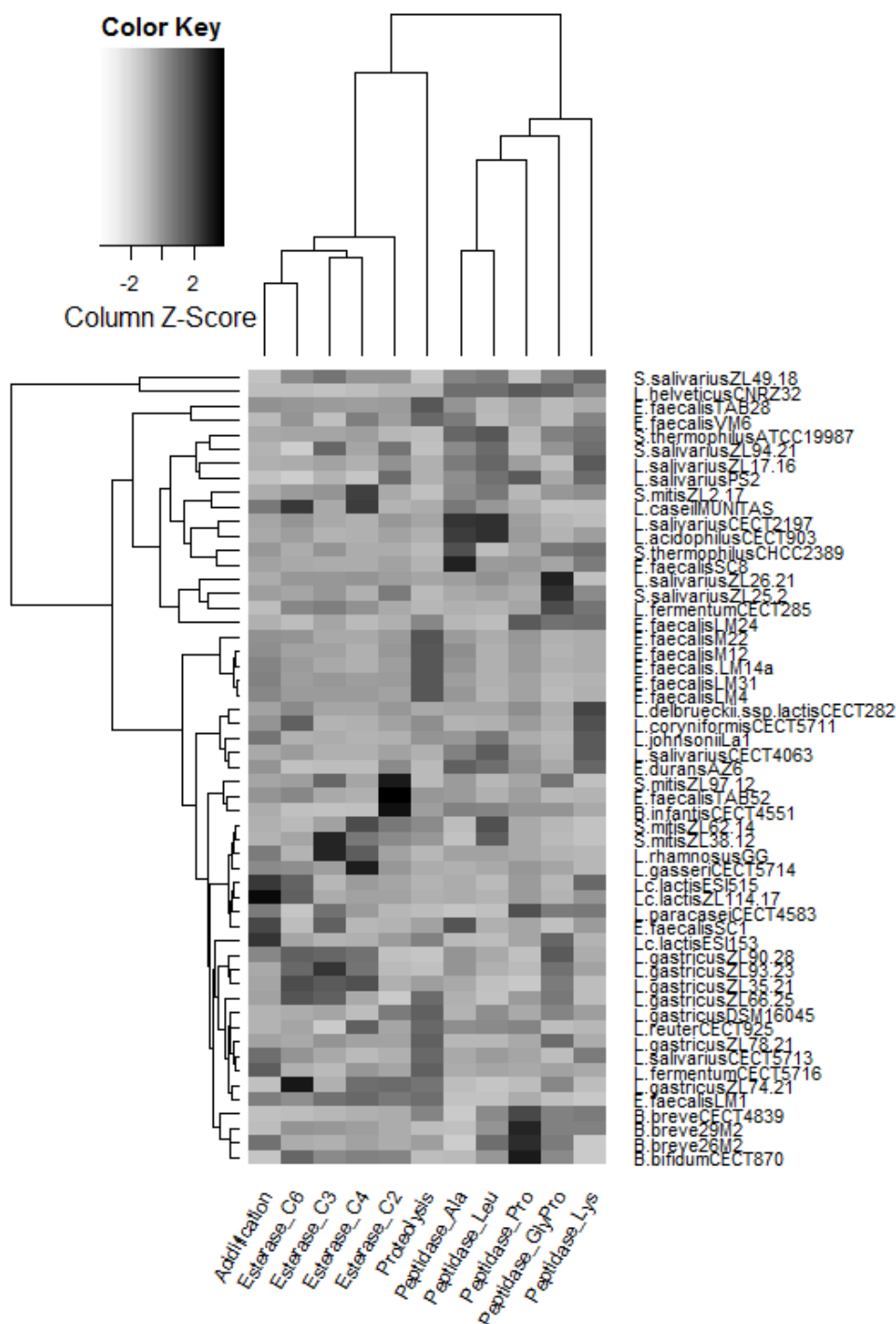


Figure 5. Heatmap showing the values of different technological properties (acidification and proteolysis in milk after 24 h and peptidase and esterase activities in CFEs using chromogenic derivatives of alanine [Ala], leucine [Leu], lysine [Lys], proline [Pro], glycine-proline [Gly-Pro], acetate [C2], propionate [C3], butyrate [C4], and caproate [C6]) of bacteria isolated from human milk and other sources. Clustering functions were applied to bacterial isolates and variables after scaling the whole data set.

IV. CARACTERIZACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE *Lactobacillus* *gastricus* AISLADOS DE LECHE MATERNA

Artículo publicado en *International Dairy Journal* (2014)



Contents lists available at ScienceDirect

International Dairy Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/idairyj

Characterisation of *Lactobacillus gastricus* strains isolated from human milk



Nivia Cárdenas^{a,b}, Virginia Martín^{a,b}, Susana Delgado^c, Juan Miguel Rodríguez^a, Leonides Fernández^{a,b,*}

^a Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

^b Probisearch, 28760 Tres Cantos, Spain

^c Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), 33300 Villaviciosa, Asturias, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 February 2014

Received in revised form

15 June 2014

Accepted 16 June 2014

Available online 1 July 2014

ABSTRACT

Lactobacillus gastricus, which was isolated and characterised for the first time from human gastric mucosa of healthy individuals, has been found recently in breast milk samples obtained from healthy women. The main objective of this work was to study technological (ability to grow in milk, acidifying activity, and some enzymatic activities) and potentially probiotic (antimicrobial potential, and resistance to the transit through the digestive tract) properties, as well as other properties related to safety (production of biogenic amines and antibiotic resistance) and storage stability, in a collection of *L. gastricus* strains previously isolated from human milk to evaluate their potential application in the dairy industry. Although a high variability among the strains was observed in most of the properties studied, the singular source of these strains and some of their biological, technological and functional attributes could be useful for dairy industry and deserve further study.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Lactobacillus is the largest and probably the most diverse and heterogeneous genus among the lactic acid bacteria (LAB), comprising more than 152 described species and including a high number of novel species (Salveti, Torriani, & Felis, 2012).

The species *Lactobacillus gastricus* was isolated and characterised for the first time during a study of LAB inhabiting human gastric mucosa in healthy individuals (Roos, Engstrand, & Jonsson, 2005). This species was phylogenetically associated to the *Lactobacillus reuteri* group, as determined by 16S rRNA and *pheS* and *rpoA* gene sequence analysis (Felis & Dellaglio, 2007; Naser et al., 2007). Although most species of the genus *Lactobacillus* have a typical rod-shaped morphology, all of *L. gastricus* and *Lactobacillus equigenrosi*, a closely related species, are spherical or oval cocci and occur singly or in pairs (Endo, Roos, Satoh, Morita, & Okada, 2008).

L. gastricus was also recently isolated from human milk samples obtained from healthy women (Martín et al., 2012). Significantly,

L. gastricus strains were present in 7 (about 33%) of the total 20 human milk samples analysed. Other lactobacilli isolates found in this study were identified as *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gas-seri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *L. reuteri*, *Lactobacillus salivarius*, and *Lactobacillus vaginalis* (Martín et al., 2012).

Human milk is considered as the best nutrition option for the infant during the first six months of life because it usually fulfils its nutritional requirements, but it also contains several biologically active components for adequate infant development. Breast milk is a continuous source of commensal and potentially probiotic bacteria to the infant gut, playing an important role in the initiation of bacterial colonisation and development of the infant gut microbiota and microbiome (Fernández et al., 2013; Jeurink et al., 2013; Jost, Lacroix, Braegger, Rochat, & Chassard, 2013; Martín et al., 2003, 2005, 2006, 2012).

The safety and *in vivo* and *in vitro* probiotic potential of some lactobacilli strains isolated from breast milk have been assessed in previous studies (Arroyo et al., 2010; Jiménez et al., 2008; Maldonado et al., 2012; Martín et al., 2005, 2006). The use of LAB isolated from human milk as probiotics is particularly attractive, considering their origin (milk) and that they fulfil some requirements generally recommended for probiotic application in humans; i.e., human origin, survival when exposed to the

* Corresponding author. Tel.: +34 91 3943745.

E-mail addresses: leonides@ucm.es, leonides@vet.ucm.es, leonides@probisearch.com (L. Fernández).

gastrointestinal (GI) tract conditions, production of antimicrobial compounds, adhesion to intestinal cells and immunomodulatory ability (Martín et al., 2005, 2006).

Taking into account the very scarce information about the properties of *L. gastricus*, both at the species and the strain level, the main objective of this work was to study technological and potentially probiotic properties in a collection of *L. gastricus* strains previously isolated from human milk of healthy women and intended to be used in dairy products.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

A total of 7 *L. gastricus* strains originally isolated from human milk of healthy women were included in the present study (Martín et al., 2012). *L. gastricus* DSM16045^T was obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSM) and was used as the reference strain (Roos et al., 2005). Bacterial strains were routinely cultured in De Man, Rogosa and Sharpe (MRS, Oxoid, Basinstoke, UK) broth supplemented with 0.05% (w/v) L-cysteine (MRS-C) at 37 °C in anaerobic conditions (85% N₂, 10% H₂, and 5% CO₂) for 24 h, unless otherwise indicated. Viable bacterial counts were determined by plating adequate dilutions of cultures on MRS-C agar plates, which were incubated as mentioned above. When indicated, bacterial strains were cultured in heat-treated (121 °C, 5 min) reconstituted 10% (w/v) skimmed milk (HT-RSM).

The indicator strains used in the antimicrobial activity assays included *Lactococcus lactis* MG1614, *Enterococcus faecalis* TAB28, *Pediococcus acidilactici* 347, *Listeria monocytogenes* Scott A, *Klebsiella oxytoca* CECT860^T from our own collection and *Kluyveromyces marxianus* CECT10357 that was provided by the Spanish Collection of Type Cultures (CECT, Burjassot, Spain). *L. gasseri* CECT5714 was employed as positive control for H₂O₂ production.

2.2. Acidifying capacity

The acidifying activity of the strains was determined in HT-RSM after inoculation (1%, v/v) with a MRS-C broth culture of the corresponding *L. gastricus* strain. The pH and acidifying activity were measured after incubation for 6, 12 and 24 h at 30 °C aerobically. The titratable acidity of HT-RSM cultures was determined by titration with 0.11 M NaOH in the presence of phenolphthalein and was expressed as the amount of lactic acid produced (g 100 mL⁻¹ of milk).

2.3. Proteolytic activity

Proteolytic activity was determined by the OPA (o-phthaldialdehyde) spectrophotometric assay in HT-RSM as described by Church, Swaisgood, Porter, and Catignain (1983). The results were expressed as the increase in OD₃₄₀ over the uninoculated control.

2.4. Enzymatic patterns

Enzymatic activity profiles were determined by using the API Zym galleries (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France), according to the manufacturer's instructions.

2.5. Aminopeptidase, esterase, and glycosidase activities

All eight *L. gastricus* strains were grown in MRS-C broth anaerobically at 37 °C until they had reached the stationary phase (24–48 h). Cells were washed with cold NaCl (0.85%, w/v) and suspended in 0.50 M sodium phosphate buffer, pH 7.0 to achieve

a 100-fold concentration factor. The concentrated cells were disrupted by mixing with the same amount of 0.1 mm diameter zirconia/silica beads (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and shaking in a Fast Prep FP120 (QBioGene, Irvine, CA, USA) at 5 m s⁻¹ for 15 s. The cells were maintained in ice between each of the four disruption cycles. Cell debris were removed by centrifugation at 19,000 × g for 15 min at 4 °C and the cell-free extract (CFE) was kept at –20 °C until use. Protein content of the CFEs was determined using a commercial reagent (Bio-Rad Laboratories, Madrid, Spain) based on Bradford dye-binding assay with bovine serum albumin as standard.

Aminopeptidase activities in CFEs were investigated using *p*-nitroanilide (*p*NA) derivatives of amino acids as chromogenic substrates. Specifically, L-alanine *p*-NA (Ala-*p*NA), L-leucine *p*-NA (Leu-*p*NA), L-lysine *p*-NA (Lys-*p*NA), L-proline *p*-NA (Pro-*p*NA), and glycyl-proline *p*-NA (Gly-Pro-*p*NA) (Sigma) were used in a multi-well plate format following the method described by Sarantinopoulos et al. (2001). Specific aminopeptidase activity was expressed as nmol of *p*-nitroaniline released per mg protein in CFE and hour.

Esterase activities in CFE were determined using the method described by Abejón Mukdsi et al. (2009) adapted to a multiwell plate format. In this case, the substrates used were α -naphthyl (α NA) derivatives of short-chain fatty acids: α NA-acetate (α NA-C₂), α NA-propionate (α NA-C₃), α NA-butyrate (α NA-C₄), and α NA-caproate (α NA-C₆) (Sigma). The assay mixture contained 18 μ L of 50 mM sodium acetate buffer pH 7, 20 μ L of 10-fold diluted CFE in 50 mM sodium acetate buffer (pH 7), and 2 μ L of 10 mM α NA derivative substrate in ethanol. The reaction was carried out for 1 h at 37 °C. Then, the colour was developed by the addition of 160 μ L of Fast Garnet GBS (Sigma) solution (1 mg mL⁻¹ in 10% (w/v) sodium dodecyl sulphate) before measuring the absorbance at 560 nm in a microtitre plate scanner spectrophotometer. A standard curve was prepared using α -naphthol (Sigma). Specific esterase activity was expressed as μ mol of α -naphthol released per mg of protein in CFE and hour.

Glycosidase activities were assayed according to the method described by Grimaldi, Bartowsky, and Jiranek (2005), using the following *p*-nitrophenyl (*p*NP)-derivatives as substrates: *p*NP- α -D-glucopyranoside (*p*NP- α Glu), *p*NP- β -D-glucopyranoside (*p*NP- β Glu), *p*NP- α -D-galactopyranoside (*p*NP- α Gal) and *p*NP- β -D-galactopyranoside (*p*NP- β Gal) (Sigma). Specific glycosidase activity was expressed as nmol of *p*-nitrophenol released per mg of protein in CFE and minute.

2.6. Production of lactic and acetic acids

Lactic and acetic acid production was determined in MRS-C broth after 48 h at 37 °C anaerobically. Cells were removed by centrifugation at 19,000 × g for 20 min, and the concentration of L- and D-lactic acid and acetic acid in the supernatants was quantified using enzymatic kits (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) following the manufacturer's instructions. MRS-C was made from its individual ingredients excluding sodium acetate to quantify the concentration of acetic acid.

2.7. Antimicrobial activity assays

The antimicrobial spectrum of *L. gastricus* strains was tested by an overlay method using whole cells grown in MRS-C plates overlaid with an indicator microorganism. Bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) production was assessed by an agar well diffusion method using neutralised, heat-treated, and filtered culture supernatants of *L. gastricus* cultures in plates inoculated with the indicator strain. Hydrogen peroxide production was determined in MRS plates

supplemented with tetramethylbenzidine and peroxidase. These assays have been described in detail by [Martín et al. \(2006\)](#).

2.8. Acid and bile tolerance

The acid tolerance was determined in MRS-C broth adjusted to pH 6, 4 or 2 with HCl. After inoculation with a fully-grown culture (1%, v/v), the mixtures were incubated at 37 °C for 2 h. The survival in the presence of bile salts was determined in MRS-C broth and HT-RSM supplemented with 0.1, 0.2, and 0.5% (w/v) porcine bile salts (Sigma) after incubation for 24 h at 37 °C anaerobically. Viable cells were determined before and after incubation by plate counting.

2.9. Adherence to mucin

The adhesion of *L. gastricus* strains to mucin was determined using porcine mucin immobilised in microtitre plates and fluorescent-labelled bacteria according to the method described by [Olivares, Díaz-Ropero, Martín, Rodríguez, and Xaus \(2006\)](#). The assay was performed in duplicate.

2.10. Formation of biogenic amines

The ability to form biogenic amines (tyramine, histamine, putrescine, and cadaverine) was qualitatively assessed using a decarboxylase medium as described by [Martín et al. \(2006\)](#). These assays were performed by duplicate.

2.11. Antibiotic resistance/susceptibility

Minimum inhibitory concentrations (MICs) of 16 antimicrobial agents were determined by a microdilution method. The strains were grown in MRS-C agar plates and suspended in 2 mL of sterile saline solution to obtain a density corresponding to McFarland standard 1. The suspension was further diluted 1:100 with a mixture of Iso-Sensitest (ITS; Oxoid) broth (50%) and MRS-C (50%), and 100 µL were added to each well of microtitre VetMIC plates for LAB (National Veterinary Institute of Sweden, Uppsala, Sweden). The MIC was defined as the lowest concentration at which no growth was observed after incubation at 37 °C in anaerobic conditions for 48 h. MICs values were compared with the microbiological cut-off values established by the European Food Safety Authority ([EFSA, 2012](#)) for *L. reuteri*. This species was selected as the reference because of its close phylogenetic relationship to *L. gastricus* ([Roos et al., 2005](#)).

2.12. Stability during different storage conditions

L. gastricus strains were grown in MRS-C broth at 37 °C in anaerobic conditions. Cells were harvested from stationary phase cultures by centrifugation at $10,000 \times g$ for 10 min at 4 °C. The pellets were washed twice with phosphate buffered saline and suspended in 10% (w/v) HT-RSM at a cell concentration of 10^9 – 10^{10} cfu mL⁻¹. Bacterial suspensions were refrigerated and stored at 3 and 8 °C for up to 28 days, or frozen and stored at –20 °C and –80 °C for up to 6 months. Bacterial viability was checked regularly by plate counting.

The concentrated cell suspensions (10^9 – 10^{10} cfu mL⁻¹) were freeze-dried in a Console Freeze Dry System with Stoppering Tray Dryer (Labconco, Kansas City, Missouri, USA) after freezing at –80 °C. Freeze drying conditions were as follows: 2 h at –20 °C, then 20 h at –15 °C, and finally 24 h at 15 °C. Vials containing the freeze-dried bacteria were then stored at 3 °C and 25 °C for up to 6 months. Viable bacteria were determined by plate counting.

2.13. Data analysis

Viable bacterial counts were recorded as cfu per mL or g and transformed to decimal logarithmic values. The experimental results are presented as mean values and standard deviations. The normality of data, homogeneity and independence of variance were checked before analysis. The significance of differences between means was assessed using a one-way, two-way or multifactor analysis of variance, followed by the Tukey test to compare means. Level of significance was set at $P < 0.05$. The analyses were performed using the StatGraphics Centurion XVI version 16.1.18 (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA).

3. Results

3.1. Growth of *L. gastricus* strains in MRS-C broth and milk

The growth at 37 °C of the *L. gastricus* strains was evaluated in MRS-C and HT-RSM ([Table 1](#)). *L. gastricus* ZL35-21 was the strain that reached the highest viable counts ($7.65 \log_{10}$ cfu mL⁻¹) after 8 h at 37 °C in MRS-C and anaerobic conditions, while ZL89-23 had the lowest value ($5.38 \log_{10}$ cfu mL⁻¹) under the same conditions. In general, the growth was faster in milk than in MRS-C broth, and anaerobic conditions favoured the growth in MRS-C for all the strains. A high variability among the strains was observed at each growth condition and incubation time. Globally, ZL35-21 displayed faster growth and higher viable counts while ZL69-21B and ZL89-23 showed slower and poorer growth. Growth of *L. gastricus* DSM16045^T reached highest concentration in aerobic conditions and differed from the strains isolated from breast milk in all conditions assayed.

3.2. Acidifying and proteolytic activities

The highest acidifying activity after 6 h at 30 °C corresponded to strains ZL35-21 (pH 6.12, 0.09 g of lactic acid per 100 mL) and ZL71-21 (pH 6.10, 0.08 g of lactic acid per 100 mL) ([Table 2](#)). After 24 h at 30 °C, none of the strains led to milk coagulation and the highest acidifying activity was displayed by strain ZL35-21 (pH 5.67, 0.26 g of lactic acid per 100 mL); most of the strains led to a pH milk decrease of <0.5 units and the final titratable acidity was <0.05 g lactic acid per 100 mL of milk ([Table 2](#)).

The proteolytic activity of the *L. gastricus* strains determined as the released free α -amino groups from milk proteins and measured as ΔOD_{340} ranged from 0.042 (ZL188-22) to 0.147 (ZL69-21B) ([Table 3](#)).

3.3. Aminopeptidase, esterase and glycosidase activities

Although some variability on the enzymatic profiles of the strains was revealed using the API Zym system, all of them displayed the following enzymatic activities: acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, α - and β -galactosidase, and α - and β -glucosidase (data not shown). Esterase (C4), esterase-lipase (C8) and leucine arylamidase were also present in ZL35-21, while *N*-acetyl- β -glucosaminidase activity was detected only in DSM16045^T. None of the strains showed alkaline phosphatase, lipase (C14), cystine arylamidase, valine arylamidase, α -chymotrypsin, trypsin, α -mannosidase, α -fucosidase or β -glucuronidase activities (data not shown).

The aminopeptidase, esterase and glycosidase activities of the *L. gastricus* strains determined in intracellular extracts are shown in [Fig. 1](#). A high degree of strain variability was noted for these enzymatic activities and, in fact, nearly each strain displayed a specific pattern. Globally, the highest peptidase activities were those targeting Gly-Pro-pNa (0.32–14.40 nmol pNA mg⁻¹ prot h⁻¹;

Table 1Growth of *L. gastricus* strains in MRS-C and milk (HT-RSM) at 37 °C.^a

Strain	MRS-C, aerobic			MRS-C, anaerobic			HT-RSM, aerobic		
	8 h	16 h	24 h	8 h	16 h	24 h	8 h	16 h	24 h
ZL33-26	5.11 ± 0.18	6.75 ± 0.01	7.16 ± 0.16	5.93 ± 0.03	6.90 ± 0.14	7.85 ± 0.15	6.02 ± 0.01	8.11 ± 0.01	8.37 ± 0.00
ZL35-21	5.38 ± 0.19	6.81 ± 0.00	7.31 ± 0.02	7.65 ± 0.07	8.90 ± 0.01	8.96 ± 0.11	7.51 ± 0.00	8.44 ± 0.00	8.28 ± 0.06
ZL69-21B	5.43 ± 0.04	5.53 ± 0.06	7.26 ± 0.06	6.30 ± 0.01	7.70 ± 0.00	8.54 ± 0.07	6.30 ± 0.00	6.67 ± 0.00	8.06 ± 0.00
ZL71-21	5.81 ± 0.00	6.54 ± 0.21	7.40 ± 0.07	6.31 ± 0.27	8.48 ± 0.01	8.30 ± 0.00	7.11 ± 0.00	7.90 ± 0.11	8.08 ± 0.06
ZL89-23	5.19 ± 0.02	5.65 ± 0.04	6.23 ± 0.06	5.38 ± 0.11	7.43 ± 0.06	8.85 ± 0.01	6.78 ± 0.00	7.95 ± 0.00	7.54 ± 0.32
ZL114-21	5.42 ± 0.02	6.49 ± 0.01	7.43 ± 0.05	6.90 ± 0.14	8.00 ± 0.00	8.59 ± 0.08	7.52 ± 0.10	8.63 ± 0.04	8.36 ± 0.17
ZL118-22	5.45 ± 0.00	6.06 ± 0.14	7.57 ± 0.25	6.23 ± 0.24	9.06 ± 0.03	8.93 ± 0.04	6.88 ± 0.03	7.98 ± 0.00	6.78 ± 0.00
DSM16045 ^T	8.19 ± 0.05	9.62 ± 0.00	9.41 ± 0.08	8.26 ± 0.13	8.93 ± 0.00	7.22 ± 0.03	7.78 ± 0.00	8.72 ± 0.00	8.89 ± 0.05

^a Growth, in log cfu mL⁻¹, is expressed as mean ± standard deviation values of replicate plate counts determined in duplicate cultures. HT-RSM: heat treated reconstituted skim milk, MRS-C: MRS broth added with 0.05% (w/v) cysteine. Multifactor ANOVA comparing the growth of the strains at different time and growth conditions. Time: $df = 2$, $F = 182.78$, $P = 0.000$; growth conditions: $df = 2$, $F = 111.59$, $P = 0.000$; strain: $df = 7$, $F = 36.28$, $P = 0.000$; where df is the degree of freedom, F is the mean square between groups/mean square within group.

Table 2Acidifying activity of *L. gastricus* strains in heat treated reconstituted skim milk (10%, w/v; initial pH 6.61) at 30 °C.^a

Strain	6 h		12 h		24 h	
	pH	Titrateable acidity (g lactic acid 100 mL ⁻¹)	pH	Titrateable acidity (g lactic acid 100 mL ⁻¹)	pH	Titrateable acidity (g lactic acid 100 mL ⁻¹)
ZL33-26	6.35 ^a	0.05 ± 0.01 ^a	6.16 ^a	0.08 ± 0.01 ^a	5.69 ^a	0.25 ± 0.01 ^a
ZL35-21	6.12 ^b	0.09 ± 0.01 ^b	5.94 ^b	0.16 ± 0.01 ^b	5.67 ^a	0.26 ± 0.00 ^b
ZL69-21B	6.50 ^a	0.03 ± 0.00 ^{a,c}	6.41 ^{c,d}	0.04 ± 0.00 ^c	6.45 ^b	0.04 ± 0.00 ^c
ZL71-21	6.10 ^b	0.08 ± 0.00 ^b	5.99 ^b	0.13 ± 0.01 ^d	5.76 ^a	0.23 ± 0.01 ^d
ZL89-23	6.42 ^a	0.04 ± 0.01 ^a	6.45 ^{d,e}	0.04 ± 0.00 ^c	6.36 ^b	0.05 ± 0.01 ^e
ZL114-21	6.49 ^a	0.03 ± 0.01 ^c	6.38 ^c	0.05 ± 0.00 ^e	6.42 ^b	0.04 ± 0.00 ^{c,e}
ZL118-22	6.51 ^a	0.03 ± 0.00 ^{a,c}	6.49 ^e	0.03 ± 0.00 ^{c,e}	6.45 ^b	0.04 ± 0.00 ^{c,e}
DSM16045 ^T	6.50 ^a	0.02 ± 0.01 ^{a,c}	6.49 ^e	0.03 ± 0.01 ^{c,e}	6.37 ^b	0.05 ± 0.00 ^e

^a Titrateable acidity is expressed as mean ± standard deviation values of replicate measurements in duplicate experiments. For each time point, in the columns, means followed by the same superscript letter did not differ significantly (one-way ANOVA, $P \leq 0.0001$) when compared using the Tukey test.

Fig. 1A). On the other hand, the lowest activities corresponded to Pro-pNA (0.03–0.21 nmol pNA mg⁻¹ prot h⁻¹; data not shown). Strain ZL33-26 exhibited the highest peptidase activity, i.e., 8.44, 8.99, and 14.40 nmol pNA mg⁻¹ prot h⁻¹ for Leu-pNA, Lys-pNA and Gly-Pro-pNA, respectively (Fig. 1A).

All strains displayed esterase activity against the four α NA derivatives ranging between 0.04 and 6.29 μ mol α NA mg⁻¹ prot h⁻¹ (Fig. 1B). The highest activities were noted for α NA-propionate (0.99–5.83 μ mol α NA mg⁻¹ prot h⁻¹) and α NA-butyrate (0.29–6.29 μ mol α NA mg⁻¹ prot h⁻¹). Two strains, ZL35-21 and ZL89-23, preferred α NA-butyrate over α NA-propionate; but no substantial differences between both substrates were found for the rest of strains. Globally, ZL35-21 and ZL118-22 exhibited the highest specific esterase activity on propionate and butyrate derivatives (Fig. 1B).

The glycosyl hydrolase activities ranged from 0.06 to 18.17 nmol pNP mg⁻¹ prot min⁻¹ (Fig. 1C). The intracellular β -glucosidase activity was the lowest in all strains and did not exceed 0.26 nmol pNP mg⁻¹ prot min⁻¹. The preferred substrates were α -D-glucopyranoside and α -D-galactopyranoside derivatives. Strains ZL69-21B and ZL33-26 displayed the highest glycosidase activities using pNP- α -D- and pNP- β -D-galactopyranoside (18.17 and 11.63 nmol pNP mg⁻¹ prot min⁻¹, respectively) as substrates.

3.4. Production of lactic and acetic acids

The concentrations of L- and D-lactic acid and acetic acid in cell-free supernatants obtained from MRS-C cultures of the *L. gastricus* strains are shown in Table 4. The concentration of total lactic acid ranged from 0.95 to 5.38 g L⁻¹. The relative amount of both lactic acid isomers varied among the strains. Most of them produced between 70 and 87% of L-lactic acid, with the exception of ZL118-22 which showed a L-lactic acid:D-lactic acid ratio of 30:70. In addition,

all the strains produced detectable amounts of acetic acid that ranged from 0.11 to 0.86 g L⁻¹, with the exception of ZL118-22, which did not produce it. Significantly, the concentration of acetic acid in the supernatant of ZL69-21B was similar to that of lactic acid (0.86 and 0.95 g L⁻¹, respectively).

3.5. Antimicrobial activity

All *L. gastricus* strains showed clear antimicrobial activity against all indicator microorganisms tested when using an overlay method, and generally the inhibition zone around the *L. gastricus* streak was ≥ 2 mm (Table 5). None of the strains showed BLIS activity in culture supernatants; neither did the whole cultures produce hydrogen peroxide when grown in solid media (data not shown).

Table 3Proteolytic activity of *L. gastricus* strains in heat treated reconstituted skim milk (10%, w/v) after 24 h at 30 °C.^a

Strain	Proteolytic activity (Δ OD340)
ZL33-26	0.048 ± 0.000 ^a
ZL35-21	0.066 ± 0.001 ^b
ZL69-21B	0.147 ± 0.000 ^c
ZL71-21	0.089 ± 0.000 ^d
ZL89-23	0.090 ± 0.000 ^d
ZL114-21	0.102 ± 0.000 ^e
ZL118-22	0.042 ± 0.001 ^f
DSM16045 ^T	0.110 ± 0.001 ^g

^a Proteolytic activity, as the increase in optical density at 340 nm, is expressed as mean ± standard deviation values of replicate measurements in duplicate experiments. Means followed by the same letter did not differ significantly (one-way ANOVA, $P = 0.0$) when compared using the Tukey test.

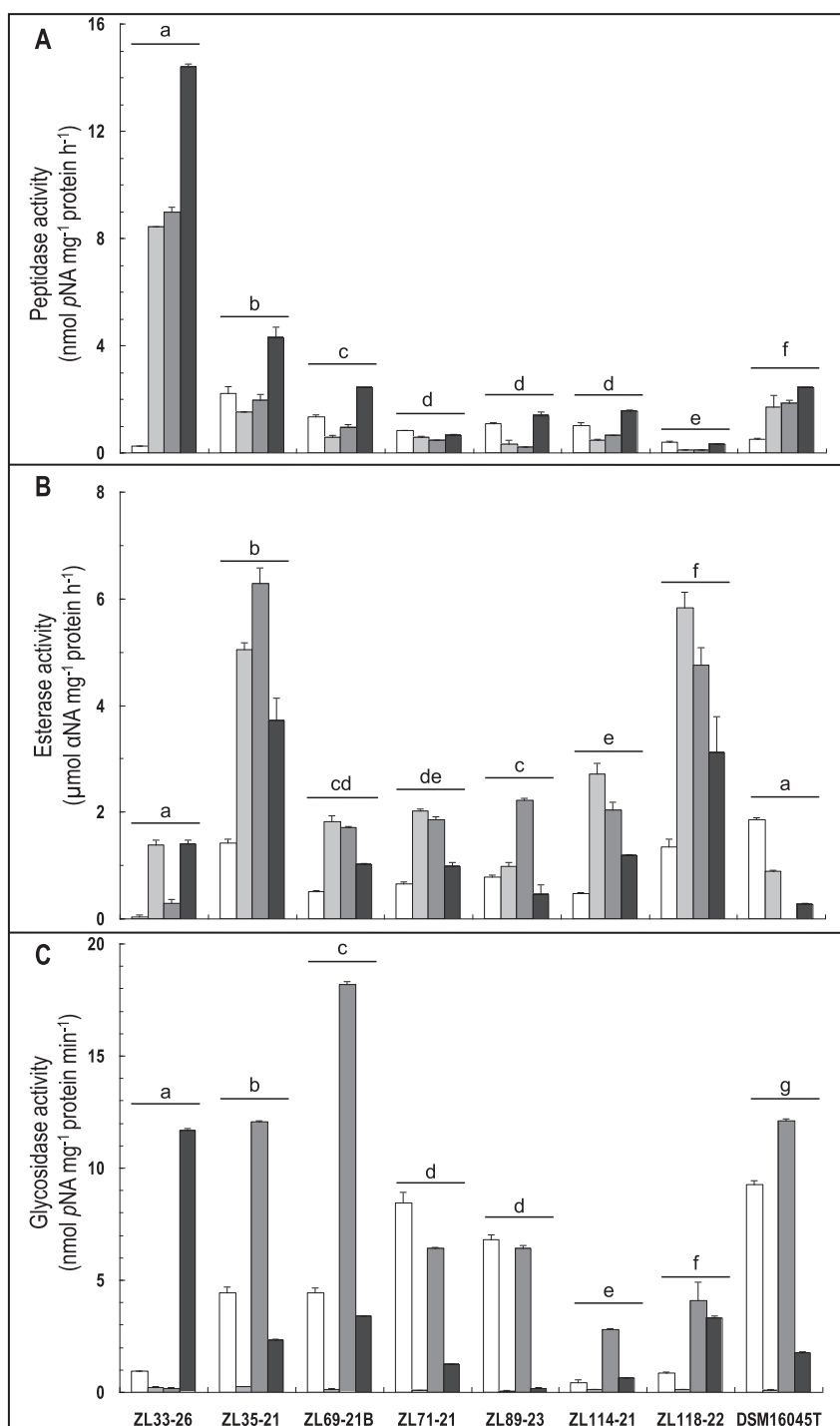


Fig. 1. Peptidase (A), esterase (B) and glycosidase (C) activities in CFE of *L. gastricus* strains isolated from human milk. Panel A: □, Ala-pNA; ▒, Leu-pNA; ▓, Lys-pNA; ■, Gly-Pro-pNA. Panel B: □, αNA-acetate; ▒, αNA-propionate; ▓, αNA-butyrate; ■, αNA-caproate. Panel C: □, pNP-α-Glu; ▒, pNP-β-Glu; ▓, pNP-α-Gal; ■, pNP-β-Gal; Enzyme activity is expressed as mean ± standard deviation (error bars) values of triplicate measurements in duplicate cultures. For each enzymatic activity, strains marked with the same letter did not differ significantly when compared using the Tukey test (two-way ANOVA comparing the values of each enzymatic activity of the strains using different substrates, $P = 0.000$).

3.6. Survival at low pH and bile tolerance

All of the strains survived after exposure to pH 6 and 4 for 2 h (Fig. 2). *L. gastricus* viable counts ranged from 7.43 to 8.18 \log_{10} cfu mL^{-1} after 2 h in MRS-C at pH 6. This represented a change that varies from a slight increase of 0.16 log cycles to a decrease of 0.61 log cycle units. In contrast, some loss of viability was observed

when the cells were suspended in MRS-C at pH 4. In this case, a reduction of 0.79–2.00 log-cycles was observed globally for all strains. However, none of the strains survived after exposition to pH 2 for 2 h (Fig. 2).

L. gastricus viable counts did not vary significantly when exposed to MRS-C broth supplemented with 0.1% (w/v) of porcine bile salts for 24 h, but decreased significantly when higher amounts

Table 4Concentration of L- and D-lactic acid and acetic acid in the cell-free supernatants obtained from MRS-C cultures of *L. gastricus* strains after 48 h at 37 °C in anaerobiosis.^a

Strain	L-Lactic acid (g L ⁻¹)	D-Lactic acid (g L ⁻¹)	L-Lactic acid:D-lactic acid	Acetic acid (g L ⁻¹)	L:A
ZL33-26	1.00 ± 0.10 ^{ab,c}	0.24 ± 0.05 ^a	81:19	0.70 ± 0.01 ^a	64:36
ZL35-21	3.44 ± 0.51 ^b	0.51 ± 0.05 ^{ab}	87:13	0.57 ± 0.01 ^b	87:13
ZL69-21B	0.74 ± 0.14 ^a	0.21 ± 0.02 ^a	78:22	0.86 ± 0.09 ^c	52:48
ZL71-21	3.93 ± 0.46 ^b	0.72 ± 0.18 ^b	85:15	0.78 ± 0.01 ^{ac}	85:15
ZL89-23	3.96 ± 0.10 ^b	1.42 ± 0.02 ^c	74:26	0.51 ± 0.05 ^b	91:9
ZL114-21	2.56 ± 0.93 ^{b,c}	0.81 ± 0.17 ^b	76:24	0.11 ± 0.02 ^c	97:3
ZL118-22	1.52 ± 0.13 ^{ac}	3.63 ± 0.13 ^d	30:70	ND ^d	100:0
DSM16045 ^T	1.05 ± 0.19 ^{ac}	0.46 ± 0.08 ^{ab}	70:30	0.13 ± 0.05 ^c	92:8

^a L- and D-lactic and acetic acid concentrations are expressed as mean ± standard deviation values of replicate measurements in duplicate assays; ND, not detectable. In each column, mean values followed by the same superscript letter did not differ significantly (one-way ANOVA, $P < 0.05$) when compared using the Tukey test. L:A, ratio of lactic acid to acetic acid.

Table 5Antimicrobial activity of the *L. gastricus* isolates as determined by an overlay method.^a

Indicator organisms	ZL33-26	ZL35-21	ZL69-21B	ZL71-21	ZL89-23	ZL114-21	ZL118-22	DSM16045 ^T
<i>Pediococcus acidilactici</i> 347	2	5	6	8	6	6	6	5
<i>Lactococcus lactis</i> MG1614	4	6	3	4	2	1	2	3
<i>Enterococcus faecalis</i> TAB28	10	15	13	10	14	13	13	14
<i>Klebsiella oxytoca</i> CETC860 ^T	2	3	1.5	3	2	2	1	2
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	3	3	2	1	1.4	2	1	3
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CECT10357	2	3	3	3	4	0	2	3

^a Values give the width of inhibition zones around the streak (mm) and are means of duplicate assays.

of bile were added (0.2 or 0.5%, w/v) (two-way ANOVA considering bile salts concentration and strain as factors, $P = 0.0$) (Fig. 3A). The reduction in viable counts ranged from 0.54 to 4.49 log cycles when porcine bile concentration increased up to 0.2% (w/v). Four strains (ZL33-26, ZL71-21, ZL114-21 and ZL118-22) did not survive in the presence of 0.5% (w/v) porcine bile salts, while others (ZL35-21, ZL69-21B, ZL89-23 and DSM16045^T) were more resistant and the reduction in their viable counts ranged from 4.65 to 6.12 log cycles (Fig. 3A). Higher survival rates were registered in HT-RSM supplemented with the same concentrations of bile salts, compared with the results obtained in MRS-C. In this case, the reduction in viable counts ranged from 0.2 to 1.91 log cycles, depending on the strain and the porcine bile salt concentration except for ZL33-26 (Fig. 3B). Globally, strain ZL33-26 was the most sensitive to bile salts, while DSM16045^T was the most resistant (Fig. 3).

3.7. Adhesion to mucin

The ability to adhere to porcine mucin varied depending on the strain, from 1.00% (±0.24%) in the case of ZL118-22 to 5.45% (±1.08%) in that of ZL33-26 (Table 6).

Table 6Adhesion to porcine mucin of *L. gastricus* strains.^a

Strain	Adhesion (%)
ZL33-26	5.45 ± 1.08 ^a
ZL35-21	2.26 ± 1.67 ^{ab}
ZL69-21B	3.47 ± 1.38 ^{ab}
ZL71-21	1.84 ± 1.10 ^{ab}
ZL89-23	4.28 ± 2.48 ^{ab}
ZL114-21	1.79 ± 0.64 ^{ab}
ZL118-22	1.00 ± 0.24 ^b
DSM16045 ^T	4.08 ± 1.19 ^{ab}

^a Adhesion to mucin (determined as the percentage of fluorescent labelled cells retained in immobilised porcine mucin) is expressed as mean values and standard deviation of replicate measurements in duplicate assays; means followed by the same superscript letter did not differ significantly (one-way ANOVA, $P = 0.014$) when compared using the Tukey test.

3.8. Production of biogenic amines

None of the *L. gastricus* isolates was able to produce detectable amounts of biogenic amines (tyramine, histamine, putrescine or cadaverine) under the conditions tested.

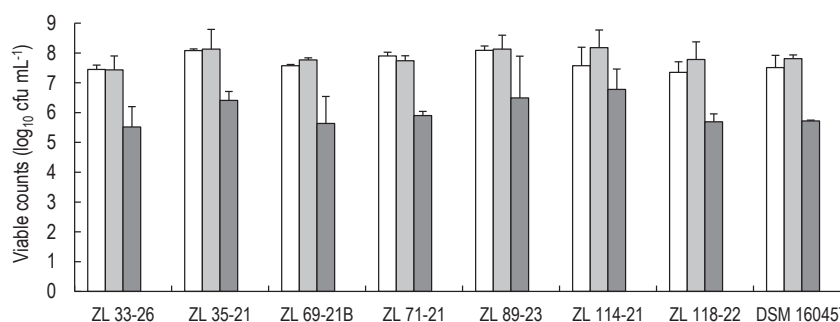


Fig. 2. Survival of *L. gastricus* strains isolated from human milk in MRS-C acidified to pH 6 (□), 4 (▒) and 2 (■) after 2 h incubation at 37 °C. Viable counts, in log₁₀ cfu mL⁻¹, are expressed as mean ± standard deviation (error bars) values of replicate plate counts determined in duplicate cultures. Initial viable bacterial counts are shown as reference (control, □). (Two-way ANOVA comparing the viability of the strains at the different pH values. pH: $df = 2$, $F = 64.01$, $P = 0.000$; strain: $df = 7$, $F = 2.15$, $P = 0.077$, where df is the degree of freedom, F is the mean square between groups/mean square within group). BS, bile salts.

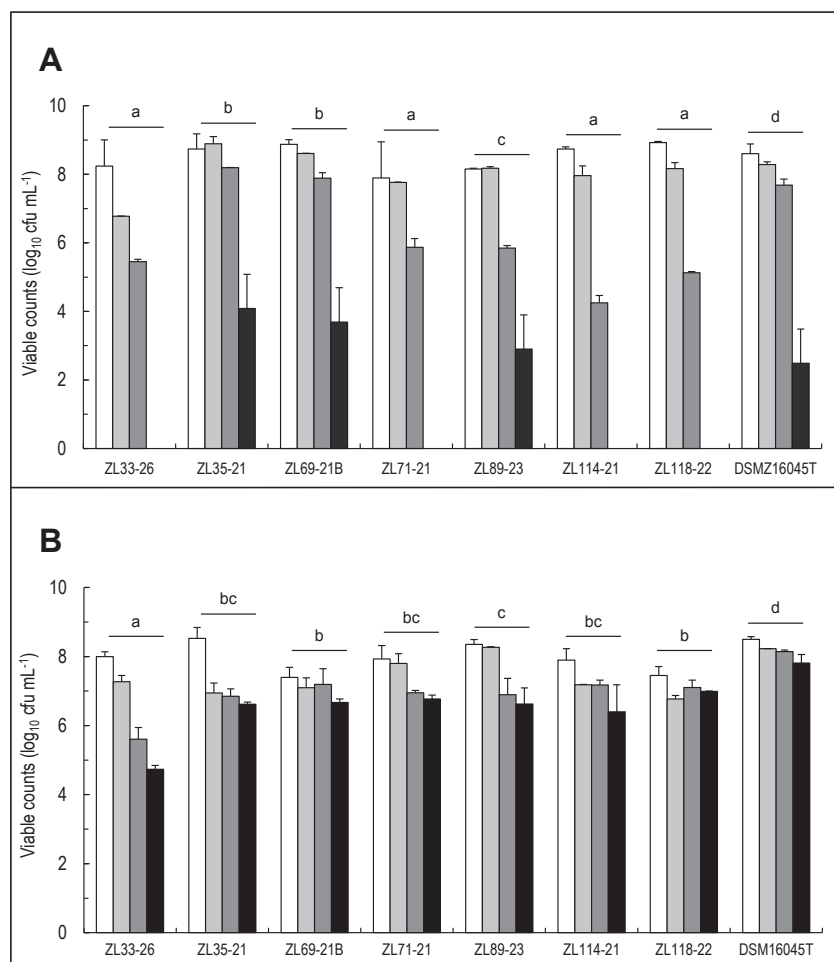


Fig. 3. Survival of *L. gastricus* strains isolated from human milk in MRS-C (A) and HT-RSM (B) containing (■) 0.1, (▒) 0.2 or (■) 0.5% (w/v) of porcine bile salts after 2 h incubation at 37 °C. Viable counts, in \log_{10} cfu mL⁻¹, are expressed as mean \pm standard deviation (error bars) values of replicate plate counts determined in duplicate cultures. Initial viable bacterial counts are shown as reference (control, □). For each graph, strains marked with the same letter did not differ significantly when compared using the Tukey test (two-way ANOVA comparing the viability of the strains at the different bile salts concentration, $P = 0.000$). BS, bile salts.

3.9. Antibiotic resistance/susceptibility

The MIC values of all *L. gastricus* strains for 16 antibiotics assayed are shown in Table 7. All strains were susceptible to clinically relevant antibiotics such as gentamycin, tetracycline, clindamycin, chloramphenicol, and ampicillin, showing MICs equal to, or lower than, the breakpoints defined by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) for the close related species *L. reuteri* (EFSA, 2012) (Table 7). The MIC values for three *L. gastricus* strains were above the corresponding cut-off values for erythromycin (strain ZL69-21B), streptomycin (strain ZL33-26), or the last two plus kanamycin (strain ZL114-21). Particularly, strain ZL114-21 showed higher MIC values to aminoglycosides than the rest of the other strains.

Apart from a clear resistance to vancomycin in all strains, no atypical resistance was observed for the rest of antibiotics analysed.

3.10. Stability during storage at different conditions

There was a high variability in the survival rate among the studied strains during cold storage at 8 and 3 °C in HT-RSM (Table 8). *L. gastricus* DSM16045^T showed the highest survival rate at 8 °C after one month (<1 log cycle reduction), followed by ZL33-26 with 1.54 log units reduction in the viable counts. The survival rate of this strain was also the highest after one month at 3 °C, followed by ZL35-

21 (0.10 and 0.12 log cycle reduction, respectively). The survival of several strains was reduced by approximately 1 log cycle after one or two weeks at both temperatures and declined notably as the storage time increased (Table 8). In contrast, the viable cell count of all the *L. gastricus* strains decreased less than 0.5 log cycles after a six-month period storage at either -20 or -80 °C (Table 9).

The viability of freeze-dried *L. gastricus* cells declined rapidly during storage at room temperature (~25 °C). In fact, a reduction higher than 1 log cycle was observed in strains ZL35-21 and ZL118-22 after one month at room temperature (data not shown). At the end of the storage period (6 months), ZL118-22 was the most sensitive strain (no viable cell could be recovered) and DSM16045^T was the most resistant (0.96 log cycle reduction); reductions ranging from 2.92 to 5.06 log cycles were observed for other strains (data not shown). When the lyophilised bacteria were stored at 3 °C the reduction in the viable cell counts after six months was notably lower, ranging from 0.13 to 0.97 log units, with the exception of strain ZL71-21 which had a reduction in viable counts of about 4.57 log cycles both at room temperature and at 3 °C (data not shown).

4. Discussion

In this work, several technological (ability to grow in milk, acidifying activity, proteolytic and other enzymatic activities), preliminary probiotic (antimicrobial potential, resistance to the GI

Table 7Minimal inhibitory concentration (MIC, expressed as $\mu\text{g mL}^{-1}$) values of 16 antibiotics to *L. gastricus* strains isolated from breast milk.^a

Strain	GEN	KAN	STP	NEO	TET	ERY	CLI	CHL	AMP	PEN	VAN	VIR	LIN	TRM	CIP	RIF
ZL33-26	8	64	128	16	4	1	≤ 0.03	1	0.12	0.12	>128	0.25	1	1	64	≤ 0.12
ZL35-21	8	32	64	16	2	0.5	0.06	0.5	0.25	0.25	>128	0.5	0.5	1	16	0.25
ZL69-21B	2	16	32	8	2	2	0.06	2	1	2	128	0.5	0.5	0.5	8	≤ 0.12
ZL71-21	2	32	32	8	1	1	≤ 0.03	0.25	0.12	0.12	>128	0.5	0.25	0.25	8	≤ 0.12
ZL89-23	2	32	64	8	1	1	≤ 0.03	0.25	0.25	0.25	>128	0.5	0.25	≤ 0.12	16	≤ 0.12
ZL114-21	8	128	128	32	4	2	0.12	4	1	0.5	>128	0.5	2	1	32	≤ 0.12
ZL118-22	2	32	64	4	1	0.25	0.03	0.5	0.25	0.12	>128	0.5	0.25	1	2	≤ 0.12
DSM16045 ^T	8	64	64	16	2	1	0.12	4	0.25	0.25	>128	0.5	1	2	64	0.25
Breakpoint ^b	8	64	64	nr	16	1	1	4	2	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr

^a Abbreviations are: GEN, gentamycin; KAN, kanamycin; STP, streptomycin; NEO, neomycin; TET, tetracycline; ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; CHL, chloramphenicol; AMP, ampicillin; PEN, penicillin; VAN, vancomycin; VIR, virginiamycin; LIN, linezolid; TRM, trimethoprim; CIP, ciprofloxacin; RIF, rifampicin; nr, not required.

^b Breakpoint: microbiological breakpoints ($\mu\text{g mL}^{-1}$) that categorise *L. reuteri* as resistant (microbiological breakpoints are defined as the MIC values that clearly deviate from those displayed by the normal susceptible populations; EFSA, 2012).

Table 8Survival of *L. gastricus* strains during refrigerated storage in heat treated reconstituted skim milk at 8 °C and 3 °C.^a

Strain	8 °C						3 °C					
	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d	P-value ^b	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d	P-value ^b
ZL33-26	9.56 \pm 0.12	9.17 \pm 0.04	8.92 \pm 0.02	8.29 \pm 0.13	8.02 \pm 0.03	0.000	9.65 \pm 0.16	9.63 \pm 0.10	9.64 \pm 0.34	9.50 \pm 0.03	9.55 \pm 0.21	0.915
ZL35-21	10.18 \pm 0.14	10.00 \pm 0.03	8.03 \pm 0.01	7.77 \pm 0.04	7.25 \pm 0.49	0.001	9.87 \pm 0.12	9.82 \pm 0.16	9.83 \pm 0.18	9.67 \pm 0.06	9.75 \pm 0.29	0.833
ZL69-21B	9.67 \pm 0.10	9.46 \pm 0.09	8.65 \pm 0.28	7.79 \pm 0.48	7.70 \pm 0.11	0.002	9.63 \pm 0.04	8.38 \pm 0.16	8.16 \pm 0.12	7.79 \pm 0.12	7.41 \pm 0.13	0.001
ZL71-21	10.00 \pm 0.14	9.29 \pm 0.05	8.35 \pm 0.10	6.73 \pm 0.11	6.37 \pm 0.03	0.000	9.90 \pm 0.14	8.99 \pm 0.20	8.51 \pm 0.13	6.93 \pm 0.04	6.60 \pm 0.05	0.000
ZL89-23	10.16 \pm 0.23	9.83 \pm 0.24	8.69 \pm 0.08	8.19 \pm 0.28	8.05 \pm 0.14	0.001	10.11 \pm 0.30	8.96 \pm 0.12	9.08 \pm 0.05	8.05 \pm 0.01	8.17 \pm 0.05	0.001
ZL114-21	9.57 \pm 0.04	8.19 \pm 0.41	8.19 \pm 0.19	5.50 \pm 0.14	5.34 \pm 0.19	0.000	10.02 \pm 0.17	9.97 \pm 0.57	9.00 \pm 0.00	9.01 \pm 0.12	7.67 \pm 0.15	0.032
ZL118-22	9.78 \pm 0.18	9.67 \pm 0.21	8.64 \pm 0.15	8.02 \pm 0.06	7.57 \pm 0.04	0.001	9.97 \pm 0.07	8.45 \pm 0.35	7.30 \pm 0.00	6.25 \pm 0.03	5.95 \pm 0.07	0.000
DSM16045 ^T	9.74 \pm 0.00	9.86 \pm 0.02	9.74 \pm 0.19	9.33 \pm 0.04	9.04 \pm 0.06	0.001	9.94 \pm 0.09	9.89 \pm 0.06	9.90 \pm 0.04	9.50 \pm 0.01	8.23 \pm 0.18	0.000

^a Growth, in log cfu mL⁻¹, is expressed as mean \pm standard deviation values of replicate plate counts in duplicate samples; P-value for one-way ANOVA comparing the survival of the strain during the storage at each temperature.

tract conditions), and safety (production of biogenic amines, antibiotic resistance) properties of *L. gastricus* strains isolated from breast milk were studied to evaluate their potential application in the dairy industry. All seven strains grew better in a milk-based medium than in complex laboratory culture media (MRS-C), which suggests intricate nutritional requirements.

Screening and characterisation of starter or adjunct cultures in the dairy industry usually involves the evaluation of acid production and proteinase activity (Cogan et al., 1997; Settanni & Moschetti, 2010). A good acid producing mesophilic starter culture will reduce the pH of milk from its normal value of about 6.6 to 5.3 in 6 h at 30 °C (Cogan et al., 1997); therefore, the *L. gastricus* strains tested in this study could be considered as poor milk acidifiers. On the other hand, their proteolytic activity, which is required for adequate bacterial growth in milk, is comparable with that of commercial probiotic *Lactobacillus* strains added to cheese or *Lactococcus* and *Enterococcus* strains isolated from artisanal cheeses (Delgado, Delgado, & Mayo, 2002; Ong, Henriksson, & Shah, 2007).

LAB metabolic activity contributes to flavour, texture, nutritional value, bioactive properties and microbiological safety of fermented dairy products (Settanni & Moschetti, 2010). An initial prospection of the metabolic potential of these *L. gastricus* strains revealed enzymatic resources that would allow the use of main milk components, such as lipids (esterase, esterase-lipase), proteins (leucine arylamidase, trypsin-like activity), and carbohydrates (gluco-, galactosidases), and provide a phosphorous supply (acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase). A detailed analysis of peptidase, esterase and glycolytic activities showed a wide strain-dependant variation.

The proteolytic system of LAB provides amino acids for the development of flavour and aroma, and/or production of bioactive compounds in dairy products (Christensen, Dudley, Pederson, & Steele, 1999; Griffiths & Tellez, 2013; Savijoki, Ingmer, &

Varmanen, 2006). High X-prolyldipeptidyl aminopeptidase (XPDAP) activity, which specifically releases X-Pro dipeptides from the N-terminus of peptides, was observed in *L. gastricus* ZL33-26. XPDAP in combination with general aminopeptidases degrade proline-rich oligopeptides derived from the action of cell wall proteinases on caseins and reduce bitterness in dairy products (Barry, O'Cuinn, Harrington, O'Callaghan, & Fitzgerald, 2001).

Bacterial lipolytic activity is also relevant for flavour development and involves both lipases and esterases capable of either synthesising or hydrolysing esters, depending on the available substrates and environmental conditions (Abejón Mukdsi et al., 2009; Holland et al., 2005; Sumby, Grbin, & Jiranek, 2010). Preferred substrates for LAB esterases are usually short-chain free fatty acids (SCFFAs), mainly C4 and C6, in agreement with the results obtained from this work (Holland et al., 2005). SCFFAs have a relatively low flavour perception threshold and impart cheesy notes, especially butyric acid, and their derived esters have lower flavour perception threshold and give fruity aroma in some cheese varieties (Liu, Holland, & Crow, 2004; Walstra & Jenness, 1984).

β -Glucosidases are widespread among LAB and are involved in the release of volatile aroma compounds from their water-soluble and less reactive glycosidic precursors in products such as wine (Pérez-Martín, Seseña, Izquierdo, Martín, & Palop, 2012; Pérez-Martín, Seseña, Izquierdo, & Palop, 2013; Spano et al., 2005). In this work, β -glucosidase activity of *L. gastricus* was found in whole cells; only residual activity was detected in intracellular extracts, which is as expected because this enzyme is usually cell-bound in lactobacilli (Pérez-Martín et al., 2012).

The control of undesirable microorganisms by LAB is related to the production of organic acids, bacteriocins and BLIS, H₂O₂ and/or reuterin (Gálvez, Abriouel, Benomar, & Lucas, 2010). These *L. gastricus* strains inhibited the growth of all the indicator organisms tested, including the yeast *K. marxianus* CECT 10357, probably due to the production of organic acids (lactic and/or acetic acid)

Table 9
Survival of *L. gastricus* strains during frozen storage (0–6 months) in heat treated reconstituted skim milk at -20°C and -80°C ^a

Strain	−20 °C						−80 °C					
	0 mo	1 mo	4 mo	5 mo	6 mo	<i>P</i> -value ^b	0 mo	1 mo	4 mo	5 mo	6 mo	<i>P</i> -value ^b
ZL33-26	9.78 ± 0.17	9.84 ± 0.04	9.43 ± 0.02	9.50 ± 0.03	9.28 ± 0.02	0.005	9.65 ± 0.02	9.37 ± 0.05	9.45 ± 0.17	9.40 ± 0.13	9.30 ± 0.14	0.188
ZL35-21	10.22 ± 0.06	10.18 ± 0.02	10.15 ± 0.10	10.18 ± 0.01	9.62 ± 0.70	0.384	10.28 ± 0.02	10.00 ± 0.29	9.74 ± 0.69	9.98 ± 0.24	9.25 ± 0.05	0.434
ZL69-21B	9.08 ± 0.17	8.95 ± 0.50	8.61 ± 0.06	8.55 ± 0.08	8.50 ± 0.18	0.236	9.13 ± 0.24	9.01 ± 0.27	8.98 ± 0.03	8.92 ± 0.18	8.60 ± 0.08	0.199
ZL71-21	9.66 ± 0.03	9.27 ± 0.02	9.22 ± 0.07	9.18 ± 0.09	9.09 ± 0.01	0.001	9.69 ± 0.00	9.24 ± 0.09	9.21 ± 0.09	9.15 ± 0.08	9.13 ± 0.08	0.003
ZL89-23	10.18 ± 0.31	10.00 ± 0.29	9.92 ± 0.02	10.03 ± 0.10	9.76 ± 0.16	0.455	10.30 ± 0.14	9.99 ± 0.08	9.70 ± 0.56	10.06 ± 0.22	9.64 ± 0.34	0.343
ZL114-21	9.06 ± 0.05	8.91 ± 0.13	8.55 ± 0.00	8.56 ± 0.16	8.17 ± 0.03	0.002	9.16 ± 0.20	8.70 ± 0.00	8.98 ± 0.34	8.59 ± 0.09	8.55 ± 0.09	0.076
ZL118-22	9.84 ± 0.09	9.49 ± 0.05	9.40 ± 0.01	9.38 ± 0.02	9.30 ± 0.01	0.002	9.71 ± 0.10	9.55 ± 0.04	9.53 ± 0.06	9.47 ± 0.02	9.52 ± 0.02	0.057
DSM16045 ^T	10.35 ± 0.01	10.12 ± 0.11	9.94 ± 0.20	9.88 ± 0.61	9.89 ± 0.41	0.636	10.35 ± 0.01	10.05 ± 0.26	9.78 ± 0.65	9.65 ± 0.21	9.71 ± 0.68	0.553

^a Growth, in log cfu mL⁻¹, is expressed as mean ± standard deviation values of replicate plate counts in duplicate samples; P-value for one-way ANOVA comparing the survival of the strain during the storage at each temperature.

since other antimicrobial compounds (BLIS or H₂O₂) were not detected in this study.

Lactobacilli isolated from human milk have been shown to have a probiotic potential that is even superior to other strains used in commercial probiotic products (Arbolea et al., 2011; Arroyo et al., 2010; Martín et al., 2005, 2006; Zacarias, Binetti, Laco, Reinheimer, & Vinderola, 2011). Orally-administered probiotics must survive a variety of stresses, including low pH due to gastric acid and the presence of bile salts in the intestine; their adhesion to gut epithelial cells is desirable (O'Sullivan et al., 2005). The *L. gastricus* strains isolated from breast milk did not survive when exposed to the hardest conditions (pH 2 for 2 h) in MRS-C broth. However, they did survive at higher pH and in the presence of up to 0.5% porcine bile salts. They also displayed the capacity to adhere to mucus in vitro. Therefore, they have the potential to colonise the GI tract.

After proper identification of the strain, safety evaluation must include the assessment of its antimicrobial resistance profile and the presence of detrimental metabolic activities to the host. Respect to antibiotic resistance, three out of the 7 *L. gastricus* strains assayed showed MIC values higher than the breakpoints established for close related species *L. reuteri*, for kanamycin (64 µg mL⁻¹), streptomycin (128 µg mL⁻¹) and erythromycin (1 µg mL⁻¹). However, since there are no official microbial cut-off values for *L. gastricus*, and the values ranged within the normal distribution observed in this set of *L. gastricus* analysed, we cannot at present categorise these three strains as resistant or susceptible. Inherent resistance to aminoglycosides, such as kanamycin and streptomycin, due to a failure of antibiotic transport in acidophilic anaerobic bacteria unable to carry out oxygen- or nitrate-dependent electron transport has been commonly reported in lactobacilli (Elkins & Mullis, 2004; Gueimonde, Sánchez, de los Reyes-Gavilán, & Margolles, 2013). High vancomycin MIC in these *L. gastricus* strains indicates a possible intrinsic resistance related with peptidoglycan structure, characteristic of many lactobacilli species. Absence of β-glucuronidase and D(-)-lactate and biogenic amines producing capacity are regarded as desirable characteristics (Sanders et al., 2010). None of the *L. gastricus* studied strains had either β-glucuronidase activity or capability of forming biogenic amines and the amount of D(-)-lactate produced was low, except for strain ZL118-22.

Complex carbohydrates derived from plant material present in the GI tract environment cannot be metabolised by humans but gut bacterial glycosidases convert them in valuable SCFFAs for the human host (Mahajan, Desai, & Lele, 2012). Humans are deficient in pancreatic α-galactosidase and do not hydrolyse α-galactosides, such as raffinose, stachyose, verbascose and melibiose, causing gastrointestinal distress due to abnormal gas accumulation. The remarkable α-galactosidase activity found in strain ZL69-21B would be a valuable activity for soy products (Carrera-Silva et al., 2006; Silvestroni, Connes, Sesma, Savoy de Giori, & Piard, 2002; Yoon & Hwang, 2008). Although information on α-glucosidase is scarce, it would allow digestion of prebiotic isomaltooligosaccharides (Møller et al., 2012). *L. gastricus* ZL71-21 and ZL89-23 displayed the highest α-glucosidase activity. On the other hand, β-glucosidase activity is involved in the hydrolysis of isoflavone glucosides naturally occurring in foods, such as soybean, increasing the bioavailability of isoflavones in fermented soymilk (Chun et al., 2008; Di Cagno et al., 2010; Donkor & Shah, 2007). Soy isoflavone consumption has been linked to a lower risk of several age- and hormone-related conditions (Vitale, Piazza, Melilli, Drago, & Salomone, 2013).

Obviously, bacterial stability and viability are a challenge for commercial manufacturing of bacterial cultures for the food industry because both must be maintained throughout processing, handling and storage of the culture and/or the food product to which the bacteria has been added. Refrigeration, freezing and

freeze-drying are the most common industrial preservation technologies applied for bacterial cultures. The ability of *L. gastricus* strains to survive during cold storage at 8 and 3 °C was limited to one or two weeks for most of the strains, but frozen storage at –20 or –80 °C determined a high viability in milk for up to six months. Our results indicate that *L. gastricus* viability during frozen storage was strain dependent, but no significant differences were noted after storage at –20 °C and –80 °C.

Recovery of *L. gastricus* cultures immediately after freeze-drying was satisfactory, even though only non-fat milk was used as cryoprotectant before freezing the cells, but the storage conditions of freeze-dried suspensions played an important role on bacteria viability. Subsequent storage of freeze-dried bacteria in a free-oxygen atmosphere preserved cell viability at cold temperature (5 °C), but not at ambient temperature that is preferred and has lower cost for distribution and commercialisation of bacterial cultures. Therefore, distribution of freeze-dried *L. gastricus* presentations would require the use of the cold chain at higher cost. However, no attempts were made to improve survival of the strains.

The singular source of these strains, breast milk of healthy women, as well as some of their biological, technological and functional attributes, is attractive. *L. gastricus* is not included in the list of taxonomic units recommended for QPS, but new *Lactobacillus* species (*Lactobacillus cellobiosus* and *Lactobacillus collinoides*) have recently been incorporated on the QPS list despite the limited body of knowledge of both species (EFSA, 2009). However, additional studies on the performance of selected *L. gastricus* strains need to be done to confirm their potential for food industry.

5. Conclusions

In conclusion, the results of this work improve the knowledge of this poorly studied *Lactobacillus* species. All seven *L. gastricus* strains were able to grow at 37 °C in milk. Their proteolytic activity was similar to probiotic commercial lactic acid bacteria, but they were poor milk acidifiers. High variability in peptidase, esterase and glucosidase activities were found among the seven strains. *L. gastricus* ZL33-26 displayed high XPDAP activity that is involved in the degradation of proline-rich oligopeptides. Significantly, several strains showed high glycosyl hydrolase activities, such as α -galactosidase, and α - and β -glucosidase, that had been related to health benefits in other *Lactobacillus* strains. Neither BLIS nor H₂O₂ production was detected in any of the seven *L. gastricus* strains, although they inhibited the growth of all the indicator organisms tested. They have potential to colonise the gastrointestinal tract, and lacked the ability to produce undesirable compounds such as D(–)-lactate and biogenic amines and did not show β -glucuronidase activity. Finally, *L. gastricus* concentrated cell suspensions were fairly stable during frozen storage and, after freeze-drying, at refrigerated storage as well as during handling and storage of a dairy product to which the bacteria had been added. Further research into this bacterial species may provide novel strains for the dairy industry.

Acknowledgements

This work was supported by the FUN-C-FOOD (Consolider-Ingenio 2010) and AGL2007-62042 projects from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

References

- Abejón Mukdsi, M., Medina, R., Katz, M., Pivotto, R., Gati, P., & González, S. N. (2009). Contribution of lactic acid bacteria esterases to the release of fatty acids in miniature ewe's milk cheese models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1036–1044.
- Arbolea, S., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Solís, G., Salminen, S., de los Reyes-Gavilán, C. G., et al. (2011). Characterization and in vitro properties of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-milk. *International Journal of Food Microbiology*, 149, 28–36.
- Arroyo, R., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Fernández, L., & Rodríguez, J. M. (2010). Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of lactobacilli isolated from breast milk. *Clinical Infectious Diseases*, 50, 1551–1558.
- Barry, C. M., O'Cuinn, G., Harrington, D., O'Callaghan, D. M., & Fitzgerald, R. J. (2001). Debiting of a tryptic digest of bovine p-casein using porcine kidney general aminopeptidase and X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2. *Journal of Food Science*, 65, 1145–1150.
- Carrera-Silva, E. A., Silvestroni, A., LeBlanc, J. G., Piard, J.-C., Savoy de Giori, G., & Sesma, F. (2006). A thermostable α -galactosidase from *Lactobacillus fermentum* CRL722: genetic characterization and main properties. *Current Microbiology*, 53, 374–378.
- Christensen, J. E., Dudley, E. G., Pederson, J. A., & Steele, J. L. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76, 217–246.
- Chun, J., Jeong, W. J., Kim, J. S., Lim, J., Park, C. S., Kwon, D. Y., et al. (2008). Hydrolysis of isoflavone glucosides in soymilk fermented with single or mixed cultures of *Lactobacillus paraplantarum* KM, *Weissella* sp. 33, and *Enterococcus faecium* 35 isolated from humans. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 573–578.
- Church, H. C., Swaisgood, F. C., Porter, D. H., & Catignain, G. L. (1983). Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 66, 1219–1227.
- Cogan, T. M., Barbosa, M., Beuvers, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P. S., Fernandes, I., et al. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, 64, 409–421.
- Delgado, S., Delgado, T., & Mayo, B. (2002). Technological performance in milk of several lactococci and enterococci strains of dairy origin. *Journal of Food Protection*, 65, 1590–1596.
- Di Cagno, R., Mazzacane, F., Rizzello, C. G., Vincentini, O., Silano, M., Giuliani, G., et al. (2010). Synthesis of isoflavone aglycones and equol in soy milks fermented by food-related lactic acid bacteria and their effect on human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10338–10346.
- Donkor, O. N., & Shah, N. P. (2007). Production of β -glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in soymilk. *Journal of Food Protection*, 73, 15–20.
- EFSA. (2009). Panel on biological hazards (BIOHAZ). Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed (2009 update). *EFSA Journal*, 7, 1431.
- EFSA. (2012). Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*, 10, 2740.
- Elkins, C. A., & Mullis, L. B. (2004). Bile-mediated aminoglycoside sensitivity in *Lactobacillus* species likely results from increased membrane permeability attributable to cholic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 7200–7209.
- Endo, A., Roos, S., Satoh, E., Morita, H., & Okada, S. (2008). *Lactobacillus equigenensis* sp. nov., a coccoid species isolated from faeces of thoroughbred racehorses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 914–918.
- Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 8, 44–61.
- Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R., et al. (2013). The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research*, 69, 1–10.
- Gálvez, A., Abriouel, H., Benomar, N., & Lucas, R. (2010). Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. *Current Opinion in Biotechnology*, 21, 142–148.
- Griffiths, M. W., & Tellez, A. M. (2013). *Lactobacillus helveticus*: the proteolytic system. *Frontiers in Microbiology*, 4, 30.
- Grimaldi, A., Bartowsky, E., & Jiranek, V. (2005). Screening of *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. for glycosidase activities that are important in oenology. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1061–1069.
- Gueimonde, M., Sánchez, B., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Margolles, A. (2013). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 4, 202.
- Holland, R., Liu, S.-Q., Crow, V. L., Delabre, M.-L., Lubbers, M., et al. (2005). Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. *International Dairy Journal*, 15, 711–718.
- Jeurink, P. V., van Bergenhenegouwen, J., Jiménez, E., Knippels, L. M., Fernández, L., Garssen, J., et al. (2013). Human milk: a source of more life than we imagine. *Beneficial Microbes*, 4, 17–30.
- Jiménez, E., Fernández, L., Maldonado, A., Martín, R., Olivares, M., Xaus, J., et al. (2008). Oral administration of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 4650–4655.
- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C. P., Rochat, F., & Chassard, C. (2013). Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environmental Microbiology*. <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.12238>. Article first published online: 3 SEP 2013.
- Liu, S.-Q., Holland, R., & Crow, V. L. (2004). Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. *International Dairy Journal*, 14, 923–945.

- Mahajan, P. M., Desai, K. M., & Lele, S. S. (2012). Production of cell membrane-bound α - and β -glucosidase by *Lactobacillus acidophilus*. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 706–718.
- Maldonado, J., Cañabate, F., Sempere, L., Vela, F., Sánchez, A. R., Narbona, E., et al. (2012). *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 is safe and well tolerated in infants of 1–6 months of age: a randomized controlled trial. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 54, 55–61.
- Martín, R., Jiménez, E., Olivares, M., Marín, M. L., Fernández, L., Xaus, J., et al. (2006). *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 35–43.
- Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M. L., Xaus, J., et al. (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *Journal of Pediatrics*, 143, 754–758.
- Martín, V., Maldonado-Barragán, A., Moles, L., Rodríguez-Baños, M., Campo, R. D., Fernández, L., et al. (2012). Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *Journal of Human Lactation*, 28, 36–44.
- Martín, R., Olivares, M., Marín, M. L., Fernández, L., Xaus, J., & Rodríguez, J. M. (2005). Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. *Journal of Human Lactation*, 21, 8–17.
- Møller, M. S., Fredslund, F., Majumder, A., Nakai, H., Poulsen, J. C., Lo Leggio, L., et al. (2012). Enzymology and structure of the GH13_31 glucan 1,6- α -glucosidase that confers isomaltotriose utilization in the probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Journal of Bacteriology*, 194, 4249–4259.
- Naser, S. M., Dawyndt, P., Hoste, B., Gevers, D., Vandemeulebroecke, K., Cleenwerck, I., et al. (2007). Identification of lactobacilli by *pheS* and *rpoA* gene sequence analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 2777–2789.
- Olivares, M., Díaz-Ropero, M. P., Martín, R., Rodríguez, J. M., & Xaus, J. (2006). Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 72–79.
- Ong, L., Henriksson, A., & Shah, N. P. (2007). Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* and *Bifidobacterium* sp. *International Dairy Journal*, 17, 67–78.
- O'Sullivan, G. C., Kelly, P., O'Halloran, S., Collins, C., Collins, J. K., Dunne, C., et al. (2005). Probiotics: an emerging therapy. *Current Pharmaceutical Design*, 11, 3–10.
- Pérez-Martín, F., Seseña, S., Izquierdo, P. M., Martín, R., & Palop, M. L. (2012). Screening for glycosidase activities of lactic acid bacteria as a biotechnological tool in oenology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1423–1432.
- Pérez-Martín, F., Seseña, S., Izquierdo, P. M., & Palop, M. L. (2013). Esterase activity of lactic acid bacteria isolated from malolactic fermentation of red wines. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 153–158.
- Roos, S., Engstrand, L., & Jonsson, H. (2005). *Lactobacillus gastricus* sp. nov., *Lactobacillus antri* sp. nov., *Lactobacillus kalixensis* sp. nov. and *Lactobacillus ultunensis* sp. nov., isolated from human stomach mucosa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 77–82.
- Salvetti, E., Torriani, S., & Felis, G. E. (2012). The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4, 217–226.
- Sanders, M. E., Akkermans, L. M. A., Haller, D., Hammerman, C., Heimbach, J., Hörmannspurger, G., et al. (2010). Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes*, 1, 164–185.
- Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M. D., Rea, M. C., Lombardi, A., Cogan, T. M., et al. (2001). Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal*, 11, 621–647.
- Savijoki, K., Ingmer, H., & Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied and Microbiological Biotechnology*, 71, 394–406.
- Settanni, L., & Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27, 691–697.
- Silvestroni, A., Connes, C., Sesma, F., Savoy de Giori, G., & Piard, J.-C. (2002). Characterization of the *mefA* locus for α -galactosidase in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5464–5471.
- Spano, G., Rinaldi, A., Ugliano, M., Moio, L., Beneduce, L., & Massa, S. (2005). A β -glucosidase gene isolated from wine *Lactobacillus plantarum* is regulated by abiotic stresses. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 855–861.
- Sumby, K. M., Grbin, P. R., & Jiranek, V. (2010). Microbial modulation of aromatic esters in wine: current knowledge and future prospects. *Food Chemistry*, 121, 1–16.
- Vitale, D. C., Piazza, C., Melilli, B., Drago, F., & Salomone, S. (2013). Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 38, 15–25.
- Walstra, P., & Jenness, R. (1984). *Dairy chemistry and physics* (Chapter 18). New York, NY, USA: Wiley.
- Yoon, M. Y., & Hwang, H. J. (2008). Reduction of soybean oligosaccharides and properties of α -D-galactosidase from *Lactobacillus curvatus* R08 and *Leuconostoc mesenteroides* JK55. *Food Microbiology*, 25, 815–823.
- Zacarias, M. F., Binetti, A., Laco, M., Reinheimer, J., & Vinderola, G. (2011). Preliminary technological and potential probiotic characterisation of bifidobacteria isolated from breast milk for use in dairy products. *International Dairy Journal*, 21, 548–555.

**V. SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE *Lactobacillus gastricus*
PS3, UNA CEPA AISLADA DE LECHE HUMANA**

Artículo publicado en *Genome Announcements* (2013)

Genome Sequence of *Lactobacillus gastricus* PS3, a Strain Isolated from Human Milk

Virginia Martín,^a Nivia Cárdenas,^a Esther Jiménez,^a Antonio Maldonado,^b Juan Miguel Rodríguez,^a Leonides Fernández^a

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain^a; Departamento de Biotecnología de Alimentos, Instituto de la Grasa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-CSIC, Seville, Spain^b

V.M. and N.C. contributed equally to this work.

***Lactobacillus gastricus* is a mostly unknown lactobacilli species associated with mucosal surfaces. We present the draft annotated genome sequence of *L. gastricus* strain PS3, isolated from a human milk sample, to provide new insights into its biology and to characterize those genes related to advantageous technological and beneficial properties.**

Received 6 June 2013 Accepted 7 June 2013 Published 11 July 2013

Citation Martín V, Cárdenas N, Jiménez E, Maldonado A, Rodríguez JM, Fernández L. 2013. Genome sequence of *Lactobacillus gastricus* PS3, a strain isolated from human milk. *Genome Announc.* 1(4):e00489-13. doi:10.1128/genomeA.00489-13.

Copyright © 2013 Martín et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported license](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

Address correspondence to Leonides Fernández, leonides@vet.ucm.es.

Lactobacillus gastricus was first isolated from gastric biopsy specimens from healthy humans and identified and described by Roos et al. (1, 2). This species has been associated with the *Lactobacillus reuteri* group according to its phylogenetic relatedness (3, 4). A recent investigation of breast milk from healthy women revealed the presence of *L. gastricus* strains in about one-third of 20 milk samples analyzed, together with other *Lactobacillus* species such as *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *L. reuteri*, *Lactobacillus salivarius*, and *Lactobacillus vaginalis* (5). The human milk microbiota has been regarded as essential for initiation and development of infant gut colonization (6–8). Furthermore, strains of *L. gasseri*, *L. fermentum*, and *L. salivarius* isolated from this biological fluid have demonstrated excellent probiotic potential (9, 10). After an initial characterization of technological and probiotic properties in a collection of *L. gastricus* strains isolated from human milk, strain PS3 was selected on the basis of some traits of probiotic and technological relevance and identified via 16S rRNA gene sequencing.

In order to get a deeper knowledge of the technological and probiotic properties of this strain, we performed whole-genome sequencing of *L. gastricus* PS3 by 454 pyrosequencing on a GS-FLX sequencer to 19.14-fold coverage (454 Life Sciences, Branford, CT). The initial draft assembly generated 93 contigs using the Newbler program version 2.3 (Roche Applied Science). The draft genome of *L. gastricus* PS3 consists of 1,904,872 bases with an average GC content of 41.8% and contains a total of 1,386 protein-encoding sequences and 43 rRNA-encoding sequences (40 tRNAs and 3 rRNAs). Coding regions were predicted using the BG7 system (Era7 Technologies, Granada, Spain), which proceeds from protein similarity detection to open reading frame (ORF) prediction and is tolerant of sequencing errors in start and stop codons, frameshifts, and assembly or scaffolding errors (11). The semiautomatic annotation of the sequences resulted in 80 final contigs, 1,269 protein-coding genes, 40 tRNA-encoding genes, and 3 rRNAs.

More than 20 peptidases and proteases and several peptide transporter genes were predicted. This highly complex proteolytic system would allow the growth in milk and compensate for deficiencies in amino acid biosynthesis. Significantly, genes encoding three different putative glutamate-cysteine ligases (PS3_6383, PS3_8988, and PS3_21018) that synthesize γ -glutamylcysteine were detected. This is the major low-molecular-weight thiol that protects against oxidative stress in some lactic acid bacteria (12). Also, one putative gene coding glutamate decarboxylase (PS3_14606) was identified. This enzyme catalyzes the synthesis of γ -aminobutyric acid, an amino acid that contributes to bacterial acid resistance and has potential as a bioactive compound in humans (13). Putative genes coding for transport systems and enzymes related to utilization of diverse carbohydrates such as fructose, galactitol, mannose, lactose, cellobiose, sucrose, and β -glucosides were also identified, as well as genes encoding two putative esterases and a GDHL lipolytic enzyme.

Nucleotide sequence accession numbers. The results of this whole-genome shotgun project have been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession number [AICN00000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AICN00000000). The version described in this paper is the first version, [AICN01000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AICN01000000).

ACKNOWLEDGMENTS

This study was partly supported by the FUN-C-FOOD (Consolider-Ingenio 2010) and AGL2010-15420 projects from the Ministerio de Economía y Competitividad (Spain).

REFERENCES

- Endo A, Roos S, Satoh E, Morita H, Okada S. 2008. *Lactobacillus equigenosus* sp. nov., a coccoid species isolated from faeces of thoroughbred racehorses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:914–918.
- Roos S, Engstrand L, Jonsson H. 2005. *Lactobacillus gastricus* sp. nov., *Lactobacillus antri* sp. nov., *Lactobacillus kalixensis* sp. nov. and *Lactobacillus ultunensis* sp. nov., isolated from human stomach mucosa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:77–82.

3. Felis GE, Dellaglio F. 2007. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 8:44–61.
4. Naser SM, Dawyndt P, Hoste B, Gevers D, Vandemeulebroecke K, Cleenwerck I, Vancanneyt M, Swings J. 2007. Identification of lactobacilli by *pheS* and *rpoA* gene sequence analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:2777–2789.
5. Martín V, Maldonado-Barragán A, Moles L, Rodríguez-Baños M, Campo RD, Fernández L, Rodríguez JM, Jiménez E. 2012. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *J. Hum. Lact.* 28: 36–44.
6. Jiménez E, Delgado S, Maldonado A, Arroyo R, Albújar M, García N, Jarrod M, Fernández L, Gómez A, Rodríguez JM. 2008. *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC Microbiol.* 8:143.
7. Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Xaus J, Fernández L, Rodríguez JM. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J. Pediatr.* 143:754–758.
8. Martín R, Heilig GH, Zoetendal EG, Smidt H, Rodríguez JM. 2007. Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *J. Appl. Microbiol.* 103:2638–2644.
9. Martín R, Olivares M, Marín ML, Fernández L, Xaus J, Rodríguez JM. 2005. Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. *J. Hum. Lact.* 21:8–17.
10. Martín R, Jiménez E, Olivares M, Marín ML, Fernández L, Xaus J, Rodríguez JM. 2006. *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. *Int. J. Food Microbiol.* 112:35–43.
11. Pareja-Tobes P, Manrique M, Pareja-Tobes E, Pareja E, Tobes R. 2012. BG7: A new approach for bacterial genome annotation designed for next generation sequencing data. *PLoS One* 7:e49239. doi:10.1371/journal.pone.0049239.
12. Kim EK, Cha CJ, Cho YJ, Cho YB, Roe JH. 2008. Synthesis of gamma-glutamylcysteine as a major low-molecular-weight thiol in lactic acid bacteria *Leuconostoc* spp. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369:1047–1051.
13. Gobbetti M, Cagno RD, De Angelis M. 2010. Functional microorganisms for functional food quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 50:716–727.

**VI. RELACIÓN ENTRE EL GENOMA Y ALGUNAS
PROPIEDADES FENOTÍPICAS *Lactobacillus fermentum* CECT
5716, UNA CEPA PROBIÓTICA AISLADA DE LECHE HUMANA**

Artículo publicado en *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*
(2015)

Relationships between the genome and some phenotypical properties of *Lactobacillus fermentum* CECT 5716, a probiotic strain isolated from human milk

Nivia Cárdenas · Jonathan E. Laiño · Susana Delgado · Esther Jiménez ·
Marianela Juárez del Valle · Graciela Savoy de Giori · Fernando Sesma ·
Baltasar Mayo · Leónides Fernández · Jean Guy LeBlanc ·
Juan M. Rodríguez

Received: 10 November 2014 / Revised: 19 January 2015 / Accepted: 22 January 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract *Lactobacillus fermentum* CECT 5716, isolated from human milk, has immunomodulatory, anti-inflammatory, and anti-infectious properties, as revealed by several in vitro and in vivo assays, which suggests a strong potential as a probiotic strain. In this work, some phenotypic properties of *L. fermentum* CECT 5716 were evaluated, and the genetic basis for the obtained results was searched for in the strain genome. *L. fermentum* CECT 5716 does not contain plasmids and showed neither bacteriocin nor biogenic amine biosynthesis ability but was able to produce organic acids, glutathione, riboflavin, and folates and to moderately stimulate the maturation of mouse dendritic cells. No prophages could be induced, and the strain was sensitive to all antibiotics proposed by European Food Safety Authority (EFSA) standards, while

no transmissible genes potentially involved in antibiotic resistance were detected in its genome. Globally, there was an agreement between the phenotype properties of *L. fermentum* CECT 5716 and the genetic information contained in its genome.

Keywords *Lactobacillus fermentum* · Genome · Glutathione · Riboflavin · Folate · Antibiotic resistance · Dendritic cells · Human milk

Introduction

It is well known that human milk is rich in many bioactive molecules, such as cytokines, immune cells, polyamines, and oligosaccharides; however, it has only recently been accepted that human milk also constitutes a source of commensal and probiotic bacteria that can colonize the infant gut and modulate its function (Fernández et al. 2013). Human milk bacteria seem to be uniquely adapted to reside in the human digestive tract and to interact with human hosts in symbiosis starting right after birth (Jeurink et al. 2013). Therefore, special interest has been focused on the selection of potentially probiotic lactobacilli or bifidobacterial strains from this biological fluid. Among these, *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 has found commercial applications due to its repertoire of desirable properties, including its ability to inhibit the growth of a wide spectrum of pathogenic bacteria (Martín et al. 2005a; Olivares et al. 2006), its role in supporting maturation of the infant immune system by acting on both innate and acquired immunity through a variety of mechanisms (Díaz-Ropero

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00253-015-6429-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

N. Cárdenas · E. Jiménez · L. Fernández · J. M. Rodríguez (✉)
Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria, Avda. Puerta de Hierro, s/n., 28040 Madrid, Spain
e-mail: jmrodrig@vet.ucm.es

N. Cárdenas · E. Jiménez · L. Fernández · J. M. Rodríguez
Probisearch, Tres Cantos, 28760 Madrid, Spain

J. E. Laiño · M. Juárez del Valle · G. Savoy de Giori · F. Sesma ·
J. G. LeBlanc
CERELA-CONICET, Centro de Referencia para Lactobacilos,
Chacabuco 145, 4000 San Miguel de Tucumán, Argentina

S. Delgado · B. Mayo
Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC),
33300 Villaviciosa, Spain

et al. 2006; Olivares et al. 2007; Pérez-Cano et al. 2010), its anti-inflammatory activity (Mañé et al. 2009), its high rate of survival in conditions simulating those in the gastrointestinal tract (Martín et al. 2005a), prebiotic metabolism (Bañuelos et al. 2008), resistance against diet polyphenols (Cueva et al. 2010), its safety (Lara-Villoslada et al. 2009; Gil-Campos et al. 2012), and its in vivo efficacy to reduce the incidence of gastrointestinal and upper respiratory tract infections in infants (Maldonado et al. 2012).

L. fermentum, a heterofermentative species of the genus *Lactobacillus*, is a normal inhabitant of the human gastrointestinal tract, including that of breast-fed infants (Grover et al. 2013). Since the benefits of probiotic bacteria are recognized as being strain-specific, a better knowledge of the genetic basis for strain-specific traits in potentially probiotic strains is required. The genome of *L. fermentum* CECT 5716 was recently sequenced and consists of a circular chromosome of 2,100,449 bp, with a GC content of 51.49 % with no plasmids (Jiménez et al. 2010). The objective of this work was to evaluate the relationship between the genetic background of *L. fermentum* CECT 5716 and certain phenotypic traits, including antimicrobials, B group vitamin and glutathione biosynthesis, glycosidase activities, presence of phages, and occurrence of antibiotic resistance genes.

Material and methods

Bacterial strain and growth conditions

L. fermentum CECT 5716 (Martín et al. 2003) was routinely grown in de Man Rogosa and Sharpe (MRS) medium (Oxoid, Basingstoke, UK) at 32 °C under aerobic conditions. When required, it was grown in anaerobiosis using a DG250 Anaerobic Workstation (Don Whitley Scientific Ltd., Shipley, West Yorkshire, UK) with a gas mixture consisting of 10 % H₂, 10 % CO₂, and 80 % N₂.

Antimicrobial activity

To check for antimicrobial activity on solid medium, overnight cultures of *L. fermentum* CECT 5716 were spotted onto MRS-Cys agar plates, incubated at 30 °C for 18 h in anaerobiosis, and overlaid with 4.5 ml soft agar inoculated with ~10⁵ colony forming units (cfu)/ml of the selected indicator strain. Plates were further incubated at 37 °C for 24 h and examined for clear halos of inhibition. Parallel bacteriocin activity in neutralized, cell-free *L. fermentum* CECT 5716 supernatants was assayed using the agar drop diffusion test as previously described (Langa et al. 2012). The following bacterial strains were used as indicators: *Lactobacillus acidophilus* NCDO 1748, *Lactobacillus brevis* LB9, *Lactobacillus casei* ATCC 334, *Lactobacillus coryniformis* Q8, *L. fermentum* ATCC

9338, *Lactobacillus hilgardii* LB76, *Lactobacillus jensenii* Ov 2967, *Lactobacillus paraplantarum* CNRZ 1885, *Lactobacillus pentosus* 128/2 and 55-1, *Lactobacillus plantarum* NC8 and ATCC 8014, *Lactobacillus reuteri* DSM 20016, *Lactobacillus salivarius* NCFB 2747, *Lactobacillus sakei* NCFB 2714, *Lactococcus lactis* MG 1363, *L. lactis* CNRZ 117, *L. lactis* IPLA 838, *L. lactis* IL 1403, *Streptococcus thermophilus* ST 112, *Leuconostoc citreum* IPLA 616, *Leuconostoc mesenteroides* INRA 33, *Pediococcus damnosus* NCDO 1832, *Pediococcus parvulus* P339, *Pediococcus pentosaceus* FBB63, *P. pentosaceus* PC1, *Enterococcus faecium* LP6T1a-20, *Enterococcus faecalis* EFI, *Listeria innocua* BL86/26, and *Staphylococcus carnosus* MC1. For this purpose, lactic acid bacteria were grown in MRS (Oxoid) medium, while the rest of indicator strains were grown in brain heart infusion (BHI, Oxoid) medium.

Hydrogen peroxide production by *L. fermentum* CECT 5716 was tested on MRS agar and broth following the procedure described by Song et al. (1999) and Yap and Gilliland (2000), respectively. The concentrations of L- and D-lactic acid and acetic acid in the broth supernatants were quantified using enzymatic kits (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) following the manufacturer's instructions.

Antibiotic resistance/susceptibility

Initially, a search for antibiotic resistance genes was performed in the genome of *L. fermentum* CECT 5716. BLAST, BLASTX, and BLASTN programs (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) were used to compare nucleotide and deduced amino acid sequences with those stored in the GenBank database. The minimal inhibitory concentration (MIC) of the 16 antibiotics included in this study (Table 1) was determined by a microdilution method using VetMIC plates for lactic acid bacteria (National Veterinary Institute of Sweden, Uppsala, Sweden), as described previously (Langa et al. 2012). The plates were incubated at 37 °C for 48 h, and the MIC was defined as the lowest concentration at which no growth was observed.

Fermentation of carbohydrates and enzymatic activities

L. fermentum CECT 5716 was grown on MRS-Cys prepared from the ingredients replacing glucose by an equivalent amount of cellobiose, lactose, maltose, or raffinose, and the bacterial growth was monitored by measuring the optical density at 600 nm (OD₆₀₀).

A cell-free extract (CFE) of *L. fermentum* CECT 5716 was prepared to determine glycosidase, peptidase, and esterase activities using chromogenic substrates as described by Cárdenas et al. (2014). Glycosidase activities were assayed using the following *p*-nitrophenyl (*p*NP) derivatives as substrates: *p*NP- α -D-glucopyranoside (*p*NP- α Glu), *p*NP- β -D-

Table 1 MIC values ($\mu\text{g/ml}$) of different antibiotics to *Lactobacillus fermentum* CECT 5715

Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Breakpoints (EFSA 2012)
Penicillin	0.25	–
Ampicillin	0.25	2
Ciprofloxacin	8	–
Gentamicin	0.5	16
Kanamycin	16	32
Streptomycin	8	64
Neomycin	1	–
Tetracycline	4	8
Erythromycin	0.12	1
Clindamycin	0.03	1
Chloramphenicol	4	4
Vancomycin	>128	Not required
Virginiamycin	0.25	–
Linezolid	1	–
Trimethoprim	1	–
Rifampicin	0.5	–

glucopyranoside ($p\text{NP-}\beta\text{Glu}$), $p\text{NP-}\alpha\text{-D-galactopyranoside}$ ($p\text{NP-}\alpha\text{Gal}$), and $p\text{NP-}\beta\text{-D-galactopyranoside}$ ($p\text{NP-}\beta\text{Gal}$) (Sigma), and the specific glycosidase activity was expressed as nanomole of p -nitrophenol released per milligram of protein in CFE and minute. Aminopeptidase activities were investigated using the chromogenic p -nitroanilide ($p\text{NA}$) derivatives of lysine ($\text{Lys-}p\text{NA}$), alanine ($\text{Ala-}p\text{NA}$), leucine ($\text{Leu-}p\text{NA}$), proline ($\text{Pro-}p\text{NA}$), and glycyl-proline ($\text{Gly-Pro-}p\text{NA}$) (Sigma-Aldrich) and expressed as micromole of $p\text{NA}$ released per milligram of protein in CFE and hour. Esterase activities were determined using α -naphthyl ($\alpha\text{-NA}$) derivatives of acetic (C2), propionic (C3), butyric (C4), and caproic (C6) acids (Sigma-Aldrich) and expressed as micromole of α -naphthol released per milligram of protein in CFE and hour.

In addition, proteolytic activity was determined by the o -phthalaldehyde (OPA) spectrophotometric assay described by Church et al. (1983). This test is based on the reaction of free α -amino groups released by hydrolysis of casein, after a 24-h incubation period in milk at 30 °C and the precipitation of nonhydrolyzed protein using trichloroacetic acid (TCA), with OPA in the presence of β -mercaptoethanol to form a complex that strongly absorbs at an optical density at 340 nm (OD_{340}). An overnight bacterial culture in MRS was centrifuged and the pellet resuspended in the same volume of buffer sodium phosphate (0.32 mM, pH 7.2). The cell suspension was added (1 %, v/v) to 10 ml of heat-treated (121 °C for 5 min) reconstituted (10 %, w/v) skim milk (HT-RSM); uninoculated samples were used as control. Proteolytic activity was expressed as the increase in OD_{340} after reaction of free α -amino groups present in the TCA-soluble filtrate with OPA in comparison with an inoculated sample.

Production of glutathione

Production of glutathione by *L. fermentum* CECT 5716 was assessed as described by Peran et al. (2006). Briefly, bacterial cells obtained in MRS broth cultures were washed with distilled water, suspended in 300 μl of TCA 7.5 % (w/v), and disrupted by stirring. The mixture was centrifuged (10,500 $\times g$ for 2 min), and the supernatant (100 μl) was transferred to a new tube containing 300 μl of MilliQ water. A portion (20 μl) from this solution was mixed with 340 μl of 0.6 M phosphate buffer (pH 7.8) and 340 μl of 1.25 mM Tris (carboxyethyl) phosphine HCl (TCEP) in 20 mM HCl. The sample was placed in the dark for 15 min, and then 800 μl of 12 mM *ortho*-phthalaldehyde in 50 mM sodium acetate was added, and samples were placed at 4 °C for 15 min. Samples were analyzed by HPLC using a Spherisorb S3 ODS column at 0.8 ml/min in isocratic mode using 50 mM sodium acetate (pH 7.7)/acetonitrile (96:4) as mobile phase.

Production of vitamins B₂, B₆, and B₁₂

L. fermentum CECT 5716 bacterial cells from an overnight culture in MRS were washed three times with saline solution, resuspended in this solution at the original culture volume, and used to inoculate (4 %, v/v) either riboflavin-, folate-, or vitamin B₁₂-free culture media (Difco, USA). Then, the inoculated media were incubated at 37 °C for 18 h without agitation. After incubation, this washing-resuspension procedure was repeated, and the resulting cell solution was used to inoculate (2 %, v/v) the respective fresh vitamin-free media. This last step was repeated seven times and, after the last incubation, samples were taken to determine extra- and intracellular vitamin concentrations. For determination of folate concentration, a sample (500 μl) of bacterial grown vitamin-free medium was mixed with equal parts of a protecting buffer (0.1 M phosphate buffer, pH 6.8, containing ascorbic acid [1.5 %, w/v]) to prevent vitamin oxidation and degradation, while acetic acid (1 %, v/v) was added in the case of riboflavin. Immediately after the addition of either the protecting buffer or acetic acid, the mixes were centrifuged for 5 min at 5,000 $\times g$. Then, the supernatant was collected (extracellular sample) and boiled for 5 min, while the pellet was resuspended in 500 μl of protecting buffer, boiled for 5 min, and centrifuged for 6 min at 10,000 $\times g$, and the corresponding supernatant was also collected (intracellular samples). All supernatants were stored at –70 °C until used for vitamin quantification.

Folate concentrations were determined by a previously described microbiological assay using *Lactobacillus rhamnosus* NCIMB 10463 as the indicator organism (Laiño et al. 2012). Briefly, samples or different concentrations of HPLC-grade folic acid (Fluka BioChemika, Sigma-Aldrich, Switzerland) were placed with the indicator strain and incubated statically during 48 h at 37 °C in 96-well sterile microplates containing

the folate-free medium (Deltalab, Argentina). The optical density was read at 580 nm (OD_{580}) using a microplate reader (VERSAmax tunable microplate reader, Molecular Devices, USA). The folate concentration of the samples was determined by comparing the OD with those obtained with the standard curve prepared using commercial folic acid. Riboflavin concentrations were determined in the same manner but using *L. rhamnosus* ATCC 7469 as the indicator strain grown in the riboflavin-free medium and confirmed by HPLC analysis as described previously (Juarez del Valle et al. 2014).

A reference method, the *Lactobacillus delbrueckii* B₁₂ assay (Horwitz 2000), was used to prepare cells extracts and, then, to analyze production of cobalamin. A cyanocobalamin (Sigma) standard curve was used to quantify the cobalamin content in the intracellular extract. The protein concentration of the extracts was estimated as described above. *L. coryniformis* CECT 5711 (Martín et al. 2005), a cobalamin-producing strain, was used as a positive control.

Prophage induction

Prophage induction was carried as described previously (Langa et al. 2012). Exponential cultures of *L. fermentum* CECT 5716 ($\sim OD_{600}=0.4$) were treated with 0.25, 0.5 (MIC), and 1 $\mu\text{g/ml}$ mitomycin C (final concentration), and incubation was continued for up to 5 h. Aliquots of the supernatants were placed on lawns of presumably susceptible *L. salivarius* strains growing in soft MRS (0.75 % agar) supplemented with 1 % hemoglobin, 10 mM CaCl_2 , and 10 mM MgSO_4 , placed on top of plates with the same medium (1.5 % agar). After incubation for 24 h, the generation of lysis plates was recorded.

Production of biogenic amines

The ability to form biogenic amines (tyramine, histamine, putrescine, and cadaverine) was assessed using the decarboxylase broth and the method described by Bover-Cid and Holzapfel (1999). The precursor amino acids (tyrosine, histidine, ornithine, and lysine, respectively) were purchased from Sigma. *L. fermentum* CECT 5716 was streaked onto the different decarboxylase medium plates and incubated for 4 days at 37 °C under aerobic and anaerobic conditions. A positive result was indicated by a change of the medium color to purple in response to the pH shift caused by the production of the more alkaline biogenic amine from the amino acid initially included in the medium.

Stimulation of immature dendritic cells

Mouse immature dendritic cells (DCs) were isolated from the spleen of female C57BL/6 mice (6–10-week age) and characterized as described previously (Lu et al. 1995). For

propagation of isolated DC, they were routinely cultured at 37 °C in a humidified 5 % CO_2 atmosphere in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) with 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin G, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin, and 20 pM β -mercaptoethanol (complete IMDM; all the components were from Sigma) and supplemented with 0.4 ng/ml mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rGM-CSF) (R&D Systems, Minneapolis, USA). The culture medium was changed every 4 days, and granulocytes and mature DCs were removed by gentle washes, after which the cultures were replenished with new medium containing fresh rGM-CSF (Lu et al. 1995).

The monoclonal anti-mouse antibodies IA/Ed (2G9) and CD86/B7.2 (GL1), which specifically recognize mouse major histocompatibility complex (MHC) II and B7.2, respectively, were purchased from PharMingen (San Diego, USA). Phycoerythrin and streptavidin were obtained from Sigma.

MRS-Cys overnight cultures of *L. fermentum* CECT 5716 were recovered by centrifugation at $6,000\times g$ for 5 min and washed twice with PBS. Then, 2×10^7 cfu was distributed in 100- μl aliquots of IMDM devoid of antibiotics and added to 10 ml fresh DC cultures containing 2×10^6 cells. The cocultures were incubated for 90 min at 37 °C, and non-inoculated DC cultures were included as negative controls. After the incubation period, cells were washed with PBS and 2 mM EDTA and maintained for 18 h at 37 °C in complete IMDM supplemented with gentamicin (250 $\mu\text{g/ml}$) and tetracycline (10 $\mu\text{g/ml}$) to kill the remaining bacteria. Then, cells were washed twice with PBS and stained with the anti-MHC class II and anti-B7.2 antibodies in order to detect both DC and the potential activation of the surface markers. Staining was performed according to standard immunofluorescence techniques, while labeling of the antibodies with phycoerythrin was carried out following the manufacturer instructions (Sigma). Finally, flow cytometry analysis was performed with a FACS scan (Becton Dickinson, San Jose, CA), and the resulting data were analyzed with the WinMDI 2.8 software. A total of 10,000 cells were analyzed through a viable cell gate determined by forward and right angle light scatter parameters to exclude subcellular particles.

Parallel, the genome of *L. fermentum* CECT 5716 was searched for the presence of open reading frames (ORFs) encoding putative proteins related to DC functionality, such as DC-SIGN1 or DC-SIGN2, or potentially involved in human molecular mimetism. For this purpose, the Words In Proteins (WIP) algorithm developed by Era7 Information Technologies (Granada, Spain) was used.

Bioinformatic analysis

BioCyc Database Collection (<http://biocyc.org/>; BioCyc 18.1) was used to search for genes involved in selected metabolic

activities (glycosyl hydrolase, proteolytic and lipolytic activities, sugar, peptide, and amino acid transport, pyruvate fermentation, and glutathione synthesis) and their orthologs in other *L. fermentum* strains in order to compare them. KEGG Pathway database was employed to search for folate and riboflavin metabolic pathways (<http://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>). Homology of genes involved in glutathione, folate, and riboflavin biosynthesis with those of other *L. fermentum* strains was performed with BLASTN 2.2.30 (Zhang et al. 2000). Information about whole genome comparison of available sequence data of ten *L. fermentum* strains (CECT 5716, IFO 3956, F-6, ATCC 14931, 28-3-CHN, 3-CHN, FTDC8312, NB-22, 3872, Lf1, and MTCC 8711) was taken from the National Center for Biotechnology (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/711>).

Results

Analysis of antimicrobial activity

L. fermentum CECT 5716 cells displayed clear antimicrobial activity against 26 strains of Gram-positive bacteria, including a variety of lactobacilli, lactococci, leuconostocs, pediococci, listeria, enterococci, streptococci, and staphylococci. High concentrations of both L- and D-lactic acid enantiomers (mean±SD, 4.92±0.29 and 3.94±0.27 mg/ml, respectively) were detected in the supernatants obtained from MRS cultures of this strain. Acetic acid could be also detected and quantified in its culture supernatants (1.73 mg/ml±0.24).

In contrast, this strain did not produce hydrogen peroxide in the assayed conditions, while its neutralized cell-free supernatants did not show bacteriocin-like activity.

Antibiotic resistance/susceptibility

MIC values were lower or equal to the microbiological breakpoints established by the European Food Safety Authority (EFSA 2012) (Table 1). RAST server (<http://rast.nmpdr.org/>) was used for the search for specific antibiotic resistance genes in the genome of *L. fermentum* CECT 5716. Several predicted coding sequences were classified as putative related with non-transmissible antibiotic resistance, including three multidrug efflux pumps, two β -lactamases, four determinants of resistance to fluoroquinolones, and four ribosome protection proteins related with tetracycline resistance (Table 2).

Fermentation of carbohydrates and enzymatic activities

L. fermentum CECT 5716 was able to grow in maltose, lactose, and raffinose (Fig. 1), as expected by the presence of putative-specific glycoside hydrolases in the genome such as α -glucosidase (EC 3.2.1.20; LC40_0498), α -galactosidase (EC 3.2.1.22; LC40_1129), and β -galactosidase (EC 3.2.1.23; LC40_0186 and LC40_0187) (Supplemental Table S1). These results related to its fermentation ability were phenotypically confirmed with the determination of glycosyl hydrolase activities in CFE of the bacterium using chromogenic substrates (Table 3). The highest glycosidase activities

Table 2 Putative antibiotic resistance genes found in the genome of *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 using the RAST server

Subsystem	Role	NCBI annotation/protein ID
Tetracycline resistance, ribosome protection type	Translation elongation factor G	Elongation factor G (EF-G)/protein_id = "ADJ41530.1"
Resistance to fluoroquinolones	DNA gyrase subunit B	DNA gyrase subunit B/protein_id = "ADJ40687.1"
Resistance to fluoroquinolones	DNA gyrase subunit A	DNA gyrase subunit A/protein_id = "ADJ40688.1"
Resistance to fluoroquinolones	Topoisomerase IV subunit B	ATP-hydrolyzing DNA topoisomerase/protein_id = "ADJ41204.1"
Resistance to fluoroquinolones	Topoisomerase IV subunit A	Topoisomerase IV subunit A/protein_id = "ADJ41205.1"
Beta-lactamase	Beta-lactamase class C and other penicillin-binding proteins	Cardiolipin synthase and penicillin-binding protein/protein_id = "ADJ40943.1" and protein_id = "ADJ41256.1"
Tetracycline resistance, ribosome protection type, too	Ribosome protection-type tetracycline resistance related proteins, group 2	Elongation factor G/protein_id = "ADJ41369.1"
Multidrug resistance efflux pumps	Multi-antimicrobial extrusion protein (Na ⁺ /drug antiporter), MATE family, of MDR efflux pumps	Na ⁺ -driven multidrug efflux pump/protein_id = "ADJ41424.1"
Multidrug resistance efflux pumps	Multidrug efflux transporter, major facilitator superfamily (MFS)	Multidrug transport protein/protein_id = "ADJ41342.1"



Fig. 1 Relative growth of *L. fermentum* CECT 5716 in MRS-Cys containing selected saccharides as the carbon source after 24 h at 32 °C under aerobic conditions. OD_{600 nm} of *L. fermentum* CECT 5716 grown in broth containing glucose was 2.050

were found for α -glucosidase and α -galactosidase substrates (7.86 ± 0.14 and 7.46 ± 0.20 nmol *p*NP mg⁻¹ protein h⁻¹, respectively), while β -glucosidase activity was almost undetectable (0.05 ± 0.03 nmol *p*NP mg⁻¹ protein h⁻¹) in the same conditions. Genome searching revealed the existence of other putative glycolytic hydrolase genes such as maltose phosphorylase (LC40_0017; pseudo-gene), xylosidase (LC40_0286), muramidase (LC40_0905), and sucrose-6-phosphate hydrolase (LC40_1000, preceded by a phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system: LC40_0998) (Supplemental Table S1). The strain neither grew when cellobiose was the only carbon source present in the broth (Fig. 1) nor showed β -glucuronidase activity and, correspondingly, no

Table 3 Glycosidase, peptidase, and esterase activities in cell-free extracts of *Lactobacillus fermentum* CECT 5716

Substrates for	Enzyme activity
Glycosidase activity (nmol <i>p</i> NP mg ⁻¹ protein h ⁻¹)	
<i>p</i> NP- α -D-glucopyranoside	7.86 ± 0.14
<i>p</i> NP- β -D-glucopyranoside	0.05 ± 0.03
<i>p</i> NP- α -D-galactopyranoside	7.46 ± 0.20
<i>p</i> NP- β -D-galactopyranoside	3.87 ± 0.92
Peptidase activity (μ mol <i>p</i> NA mg ⁻¹ protein h ⁻¹)	
Ala- <i>p</i> NA	0.58 ± 0.07
Leu- <i>p</i> NA	0.69 ± 0.05
Lys- <i>p</i> NA	0.97 ± 0.14
Pro- <i>p</i> NA	0.86 ± 0.00
Gly Pro- <i>p</i> NA	0.94 ± 0.01
Esterase activity (μ mol α -naphthol mg ⁻¹ protein h ⁻¹)	
α -NA acetate (C2)	0.34 ± 0.33
α -NA propionate (C3)	0.16 ± 0.13
α -NA butyrate (C4)	0.78 ± 0.50
α -NA caproate (C6)	0.16 ± 0.14

genes involved in such activity could be detected in its genome, although a putative PTS system cellobiose-specific transporter subunit IIC (LC40_0732) was identified (Supplemental Table S1).

L. fermentum CECT 5716 did not show remarkable proteolytic activity (Δ OD₃₄₀=0.07) as determined by the OPA method, while discrete peptidase activities were exhibited by the CFE of the strain (Table 3). More than 50 genes encoding for proteins related to proteolysis (~25) and peptide and amino acid transport (~30) were found in the genome sequence of *L. fermentum* CECT 5716 (Supplemental Tables S2 and 3). Apart from proteases involved in physiological processes, several proteolytic enzymes that would allow hydrolysis of milk protein to obtain essential amino acids were identified including four endopeptidases (serine-type LC40_0013 and LC40_0417 and metalloendopeptidases LC40_0482 and LC40_1149), one oligoendopeptidase (LC40_1124, similar to PepF), six dipeptidases (LC40_0361, LC40_0652, LC40_0730, LC40_0819, LC40_0857, and LC40_1116), and five aminopeptidases (LC40_0125, LC40_0190, LC40_0568, LC40_1057, and LC40_1058) (Supplemental Table S3). Significantly, genes encoding several peptidases specific for proline-containing peptides were recognized: X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase (PepX; LC40_1057) that liberates Xaa-Pro dipeptides from the N-terminus of peptides, two prolidases or Xaa-Pro dipeptidases (PepQ; LC40_0361 and LC40_0819), and proline aminopeptidase (PepI; LC40_0417) that releases N-terminal proline residues from a peptide.

Regarding the esterase activity of *L. fermentum* CECT 5716, the preferred chromogenic substrate was the butyrate derivative (Table 3). In contrast to proteolytic enzymes, only six genomic sequences related to esterase activity were inferred by computational analysis (LC40_0189, LC40_0973, LC40_0208, LC40_0642, and LC40_0987), and three of them encoded proteins of the esterase/lipase superfamily containing the GXSG active site and the characteristic alpha/beta hydrolase fold of hydrolases (Supplemental Table S4).

Furthermore, the genes comprising the whole pyruvate fermentation pathway to diacetyl, acetoin, and 2,3-butanediol, considered as important flavor compounds in dairy products, were found distributed across the chromosome/acetolactate synthase (EC 2.2.1.6; LC40_0670), acetolactate decarboxylase (EC 4.1.1.5; LC40_0293, acetoin dehydrogenase (EC 1.1.1.303; LC40_0950), and butanediol dehydrogenase (EC 1.1.1.4; LC40_0618).

Production of glutathione and vitamins B₂, B₆, and B₁₂

L. fermentum CECT 5716 produced relatively high amounts of glutathione (1.54 ± 0.29 mM) in culture media. The synthesis of glutathione from its three amino acids precursors (L-glutamate, L-cysteine, and glycine) is usually carried out in

two steps: the first step consists in the condensation of L-glutamate and L-cysteine by the enzyme glutamate-cysteine ligase or gamma-glutamylcysteine synthetase (EC 6.3.2.2), while the second and final steps, where the glycine is added to the C-terminal end of γ -glutamylcysteine, are catalyzed by the enzyme glutathione synthetase (EC 6.3.2.3) (Supplemental Fig. S1). A total of four genes encoding proteins with glutamate-cysteine ligase activity were identified in the *L. fermentum* CECT 5716 genome (LC40_0421, LC40_0664, LC40_0686, and LC40_0924). Putative proteins encoded by all four genes (ADJ41044.1, 456 amino acids; ADJ41274.1, 298 amino acids; ADJ41296.1, 501 amino acids; and ADJ41495.1, 512 amino acids) displayed the glutamate-cysteine ligase family 2 (GCS2) motif and were related to the glutamate-cysteine ligase activity; the product of LC40_0686 was the only putative protein that was also associated to glutathione synthetase activity (Supplemental Fig. 1).

In addition, this strain was able to grow in absence and produce both vitamins B₂ and B₆. The concentrations (mean \pm SD) of intracellular and extracellular riboflavin were 290 ± 30 and 333 ± 50 ng/ml, respectively (total concentration 623 ng/ml). In the case of folate, the intracellular and extracellular concentrations were 42 ± 5 and 106 ± 8 ng/ml, respectively (total concentration, 148 ng/ml). The gene clusters responsible for the production of both vitamins (riboflavin: LAF_0736, LAF_0773, LAF_0774, LAF_0775, and LAF_0776; folates: LAF_0498; LAF_0888, LAF_1066, LAF_1080, LAF_1081, LAF_1082, LAF_1336, LAF_1338, LAF_1339, LAF_1340, and LAF_1341) were identified in the genome of *L. fermentum* CECT 5716 (Supplemental Figs. S2 and 3). This strain did not produce cyanocobalamin, and no gene involved in the biosynthesis of this vitamin could be found in its genome.

Prophage induction

L. fermentum CECT 5716 supernatants did not generate typical phage-related inhibition halos or plaques of lysis on lawns of any of 11 *L. fermentum* strains tested. Genes encoding a complete prophage were not detected in the genome of *L. fermentum*; however, a few phage-related genes were found (e.g., LC40_0445 phage antirepressor, LC40_0324 phage helicase, LC40_0325 phage primase, LC40_0327 phage terminase, LC40_0328 phage portal protein, and LC40_0329 phage capsid protein).

Production of biogenic amines

Production of biogenic amines (tyramine, histamine, putrescine, or cadaverine) by *L. fermentum* CECT 5716 could not be detected and, in correspondence, no gene involved in the biosynthesis of such compounds could be detected in its genome.

Stimulation of immature dendritic cells

The WIP algorithm showed that the genome of *L. fermentum* CECT 5716 does not encode proteins related to DC functionality, such as DC-SIGN1 or DC-SIGN2, or potentially involved in human molecular mimetism. The ability of *L. fermentum* CECT 5716 to stimulate the in vitro maturation of immature DCs was assessed. The strain enhanced presentation of the coestimulatory molecule B7.2 (CD86) and MHC class II on the surfaces of DC. These markers were detected in 39.2 and 42.0 %, respectively, of the co-cultured DC. In contrast, the values corresponding to DC that were not exposed to the bacterial strains were significantly lower (11.9 and 10.1 %, respectively).

Global comparison between *L. fermentum* CECT 5716 and other *L. fermentum* strains

The complete genome of *L. fermentum* CECT 5716 consists of a circular chromosome which contains 1,051 predicted protein-encoding genes, 54 tRNA-encoding genes, and 20 rRNA-encoding genes. The comparison of the CECT 5716 and other *L. fermentum* genomes revealed that it was highly similar to that of IFO 3956 (Supplemental Fig. S4).

Discussion

The relationship between the genotype and phenotype of *L. fermentum* CECT 5716 regarding some specific traits was evaluated in this study. Lactobacilli have been long considered to a part of the microbiological barrier to infection by intestinal pathogens. The production of inhibitory substances, such as organic acids, bacteriocins, or hydrogen peroxide, may affect undesirable or pathogenic bacteria. In this study, *L. fermentum* CECT 5716 was able to produce lactic acid and acetic acid, but production of bacteriocin-like substances or hydrogen peroxide could not be detected. This is in agreement with its genome since it did not contain genes or gene clusters involved in the biosynthesis of antimicrobial substances other than organic acids. Thus, production of such acids and/or exclusive competition processes may be responsible for the antimicrobial activity of this strain. In fact, *L. fermentum* CECT 5716 has the ability to inhibit the growth or the adhesion to mucins of a wide spectrum of pathogenic bacteria (Martín et al. 2005a; Olivares et al. 2006) and increases the survival of mice infected with this pathogen (Olivares et al. 2006). This strain exerts a protective role even in a in vivo murine septic shock model (Arribas et al. 2009), while a trial in 6-month-old infants led to a reduction in the incidence of intestinal and respiratory infections (Maldonado et al. 2012).

Obligately heterofermentative lactobacilli, such as *L. fermentum*, produce CO₂, ethanol, acetate, and lactate from metabolism of glucose, a fact that is clearly reflected in the genome of *L. fermentum* CECT 5716. Although the primary catabolic pathway for glucose metabolism in *Lactobacillus* is assumed to be the glycolytic pathway, the *pfk* and the *fba* genes encoding 6-phosphofructokinase and fructose-bisphosphate aldolase, respectively, are absent from the *L. fermentum* CECT 5716 genomes. The *pfk* and *fba* genes are essential for the glycolytic pathway, and it has been suggested that the lack of such genes may be a specific feature of heterofermentative lactobacilli (Morita et al. 2008). On the other hand, *L. fermentum* CECT 5716 has the complete gene set for the pentose phosphate pathway, which indicate that this strain uses the pentose phosphate pathway to metabolize glucose, a fact previously observed in the genomes of *L. reuteri* JCM 1112 and *L. fermentum* IFO 3956 (Morita et al. 2008).

L. fermentum CECT 5716 showed a particularly high α -galactosidase activity. α -Galactooligosaccharides found in legumes, such as soybeans, can cause gastrointestinal disorders since mammals lack this enzyme in their small intestines, which is necessary for their hydrolysis. In a previous study, LeBlanc et al. (2005) found that *L. fermentum* CRL 722 was able to deliver active α -galactosidase activity in the small intestine of rats. Later, it was observed that this strain was able to overcome host α -galactosidase deficiency, as evidenced by reduction of hydrogen excretion in rats consuming soya α -galactooligosaccharides (LeBlanc et al. 2008). This observation offers interesting perspectives in lactic acid bacteria (LAB) application as vectors for delivery of digestive enzymes.

This study confirmed that *L. fermentum* CECT 5716 is able to produce glutathione, a fact previously described (Peran et al. 2006) but uncommon among lactobacilli, which was related to the presence of genes involved in the biosynthesis of this antioxidant compound. Glutathione is a sulfhydryl-derived compound that actively participates in the antioxidant mechanisms of the intestinal mucosa, preserving it from oxidant-induced tissue damage. Several antioxidant compounds, such as flavonoids or vitamin E, have been reported to exert anti-inflammatory activity through the restoration of glutathione colonic mucosal levels in experimental models of rat colitis (Gonzalez et al. 2001; Camuesco et al. 2004). Different studies have reported diminished glutathione content in inflammatory bowel diseases (Miralles-Barrachina et al. 1999) and that glutathione supplementation results in beneficial effects in experimental colitis (Ardite et al. 2000; Loguercio et al. 2003). *L. fermentum* CECT 5716 has already shown a strong anti-inflammatory effect in a 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) model of rat colitis (Peran et al. 2006). These authors suggested that the inhibitory effect on leucocyte infiltration was the result of the preventative effect exerted by the probiotic against the free radical derived oxidative injury that takes place after TNBS

instillation in the colonic tissue, since the intestinal anti-inflammatory effect was associated with a restoration of the colonic glutathione levels in comparison with non-treated colitic rats. Therefore, they concluded that the free radical scavenger properties attributed to glutathione produced by this probiotic was crucial in its anti-inflammatory effect. In addition, other *L. fermentum* strains (E-3 and E-18) have also been reported to possess strong anti-oxidative properties (Kullisaar et al. 2002).

Traditionally, LAB have been considered consumers of group B vitamins. However, several studies have reported the strain-specific ability of some LAB to synthesize folate (Sybesma et al. 2003; LeBlanc et al. 2007; Santos et al. 2008), riboflavin (Martín et al. 2010; Jayashree et al. 2011) and/or cobalamin (Taranto et al. 2003; Martín et al. 2005). In this study, *L. fermentum* CECT 5716 produced riboflavin and folate but not cobalamin. The contribution of the microbiota to the folate requirements of the high cell turnover intestinal epithelium is unknown, but a mechanism for luminal folate absorption by cells in the human colon has been reported (Dudeja et al. 2001), which suggests that folate produced in situ by the colonic microbiota may be utilized by cells in the colonic epithelium. In fact, it has recently been shown that bacterially synthesized folate is absorbed across the large intestine and incorporated into the liver and kidneys of piglets (Asrar and O'Connor 2005). *L. fermentum* CECT 5716 was originally isolated from breast milk, and it is interesting to note that oral administration of human milk to rats increased plasma folate concentration and total cecal material folate content by 42 and 48 %, respectively (Krause et al. 1996). These authors suggested that the improved folate status of rats fed human milk-containing diets was due, at least in part, to increased folate synthesis by folate-synthesizing microbes in the cecum and colon. Furthermore, it has been suggested with the expanding availability of genome sequences that it is not only possible to identify potential vitamin-producing probiotic strains but also to understand the intertwined mechanisms for their biosynthesis, all of which will be exploited to increase the vitamin-producing capacities in the gastrointestinal tract of humans (LeBlanc et al. 2013).

Cobalamin biosynthesis is limited to a few representatives of bacteria and archaea and, among LAB, *L. reuteri* was the first one reported to be able to produce this vitamin (Taranto et al. 2003). Recently, the comparison of the genomes of *L. reuteri* JCM 1112 and *L. fermentum* IFO 3956 showed that JCM 1112 possesses the gene sets (*cbl*, *cob*, and *hem*) for cobalamin biosynthesis (Morita et al. 2008). A comparison of this genetic locus with the corresponding locus in *L. fermentum* IFO 3956 revealed that this gene cluster is inserted into a locus that is common to both bacteria (and also to *L. fermentum* CECT 5716), suggesting that such a cluster is a genomic island that has been acquired through lateral gene transfer. Such an island is also absent in *L. fermentum* CECT 5716 genome.

Antibiotic MIC values were lower or equal to the microbiological breakpoints established by the EFSA (2012), and were within the susceptible ranges reported elsewhere (Egervam et al. 2007). The RAST server (<http://rast.nmpdr.org/>) was used for the search for specific antibiotic resistance genes in the genome of *L. fermentum* CECT 5716. Several predicted coding sequences were classified as putatively related with antibiotic resistance (Table 2). Among them, three multidrug efflux pumps, two β -lactamases, four determinants of resistance to fluoroquinolones, and four assigned to ribosome protection proteins related with tetracycline resistance were detected. However, none of these genes correlated with a clear antibiotic resistance phenotype, and this fact may account for the susceptibility of the strain to tetracycline and other antibiotics. The presence of genes displaying homology to tetracycline resistance genes is not surprising, as elongation-like factors involved in translation are related to ribosome protection-type tetracycline resistance proteins (Connell et al. 2003).

RAST annotation assigned a role in resistance to fluoroquinolones to four ORFs: *parE*, *parC*, *gyrA*, and *gyrB*. However, these genes are actually thought to be necessary for DNA replication. High and moderate MICs to ciprofloxacin, an inhibitor of DNA synthesis, have been previously reported in lactobacilli (Katla et al. 2001; Danielsen and Wind 2003).

Multidrug efflux transporters are involved in many detoxifying activities in the cell (Piddock 2006) and are widely spread among many LAB species. Therefore, they are anticipated to have a physiological role in other cellular processes rather than be associated with antibiotic resistance. Finally, ORFs encoding β -lactamase class C proteins and other penicillin-binding proteins in *L. fermentum* CECT 5716 are probably involved in peptidoglycan biosynthesis, having no relationship with β -lactam resistance. Globally, no transmissible antibiotic resistance gene could be detected in the *L. fermentum* CECT 5716 genome and, therefore, this strain can be considered as safe from this point of view.

In this work, the cell surface expression of B7-2 and MHC class II determinants by mouse DC was moderately stimulated by *L. fermentum* CECT 5716. Using the same model, better results were reported for *L. salivarius* CECT 5713 but the genome of such strain contained genes involved in DC-mediated molecular mimetism that have not been found in that of *L. fermentum* CECT 5716 (Langa et al. 2012).

Globally, the results of this work provide some clues on the relationship between some phenotypic properties of *L. fermentum* CECT 5716 and their subjacent molecular basis. In silico analysis has shown to be effective in predicting specific beneficial properties of this probiotic bacterium since all of the evaluated phenotypes were correlated with the presence of the genes or gene clusters involved. Functional genomics and comparative genomics such as those performed partially in this study pave the way for the evaluation and search for

novel probiotic strains or to understand the mechanisms by which these beneficial microorganisms provide benefits to their host.

Acknowledgments This work was supported by CSD2007-00063 (FUN-C-FOOD, Consolider-Ingenio 2010), CYTED-IBEROFUN, and AGL2013-41980-P projects from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain), a research contract funded by Biosearch Life (Granada, Spain) and by funding from the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) and Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), Argentina.

References

- Ardite E, Sans M, Panes J, Romero FJ, Pique JM, Fernandez-Checa JC (2000) Replenishment of glutathione levels improves mucosal function in experimental colitis. *Lab Invest* 80:735–744
- Arribas B, Rodríguez-Cabezas ME, Comalada M, Bailon E, Camuesco D, Olivares M, Xaus J, Zarzuelo A, Gálvez J (2009) Evaluation of the preventative effects exerted by *Lactobacillus fermentum* in an experimental model of septic shock induced in mice. *Br J Nutr* 101: 2–4
- Asrar FM, O'Connor DL (2005) Bacterially synthesized folate and supplemental folic acid are absorbed across the large intestine of piglets. *J Nutr Biochem* 16:587–593
- Bañuelos O, Fernández L, Corral JM, Valdivieso-Ugarte M, Adrio JL, Velasco J (2008) Metabolism of prebiotic products containing beta(2–1) fructan mixtures by two *Lactobacillus* strains. *Anaerobe* 14: 184–189
- Bover-Cid S, Holzapfel WH (1999) Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 53:33–41
- Camuesco D, Comalada M, Rodríguez-Cabezas ME, Nieto A, Lorente MD, Concha A, Zarzuelo A, Galvez J (2004) The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *Br J Pharmacol* 143:908–918
- Cárdenas N, Calzada J, Peirotén A, Jiménez E, Escudero R, Rodríguez JM, Medina M, Fernández L (2014) Development of a potential probiotic fresh cheese using two *Lactobacillus salivarius* strains isolated from human milk. *Biomed Res Int*. doi:10.1155/2014/801918
- Church FC, Swaisgood HE, Porter DH, Catignain GL (1983) Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J Dairy Sci* 66: 1219–1227
- Connell SR, Tracz DM, Nierhaus KH, Taylor DE (2003) Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 47:3675–3681
- Cueva C, Moreno-Arribas MV, Martín-Alvarez PJ, Bills G, Vicente MF, Basilio A, Rivas CL, Requena T, Rodríguez JM, Bartolomé B (2010) Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Res Microbiol* 161:372–382
- Danielsen M, Wind A (2003) Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int J Food Microbiol* 82:1–11
- Díaz-Ropero M, Martín R, Sierra S, Lara-Villoslada F, Rodríguez JM, Xaus J, Olivares M (2006) Two *Lactobacillus* strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response. *J Appl Microbiol* 102:337–343
- Dudeja PK, Kode A, Alnounou M, Tyagi S, Torania S, Subramanian VS, Said HM (2001) Mechanism of folate transport across the human colonic basolateral membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281:G54–60

- EFSA (2012) Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. EFSA J 10: 2740
- Egervarn M, Danielsen M, Roos S, Lindmark H, Lindgren S (2007) Antibiotic susceptibility profiles of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*. J Food Prot 70:412–418
- Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, Rodríguez JM (2013) The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. Pharmacol Res 69:1–10
- Gil-Campos M, López MÁ, Rodríguez-Benítez MV, Romero J, Roncero I, Linares MD, Maldonado J, López-Huertas E, Berwind R, Ritzenthaler KL, Navas V, Sierra C, Sempere L, Geerlings A, Maldonado-Lobón JA, Valero AD, Lara-Villoslada F, Olivares M (2012) *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 is safe and well tolerated in infants of 1–6 months of age: a randomized controlled trial. Pharmacol Res 65:231–238
- Gonzalez R, Sanchez de Medina F, Galvez J, Rodriguez-Cabezas ME, Duarte J, Zarzuelo A (2001) Dietary vitamin E supplementation protects the rat large intestine from experimental inflammation. Int J Vitam Nutr Res 71:243–250
- Grover S, Sharma VK, Mallapa RH, Batish VK (2013) Draft genome sequence of *Lactobacillus fermentum* Lfl, an Indian isolate of human gut origin. Genome Announc 1:e00883–13
- Horwitz W (2000) Official methods of analysis of AOAC international. AOAC International, Gaithersburg
- Jayashree S, Rajendhran J, Jayaraman K, Kalaichelvan G, Gunasekaran P (2011) Improvement of riboflavin production by *Lactobacillus fermentum* isolated from yogurt. Food Biotechnol 25:240–251
- Jeurink PV, van Bergenhenegouwen J, Jiménez E, Knippels LM, Fernández L, Garssen J, Knol J, Rodríguez JM, Martín R (2013) Human milk: a source of more life than we imagine. Ben Microbes 4:17–30
- Jiménez E, Langa S, Martín V, Arroyo R, Martín R, Fernández L, Rodríguez JM (2010) Complete genome sequence of *Lactobacillus fermentum* CECT 5716, a probiotic strain isolated from human milk. J Bacteriol 192:4800
- Juarez del Valle M, Laiño J, Savoy de Giori G, LeBlanc JG (2014) Use of lactic acid bacteria as a biotechnological strategy to increase riboflavin levels in soymilk. Food Res Int 62:1015–1019
- Katla A-K, Kruse H, Johnsen G, Herikstad H (2001) Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. Int J Food Microbiol 67:147e52
- Krause LJ, Forsberg CW, O'Connor DL (1996) Feeding human milk to rats increases *Bifidobacterium* in the cecum and colon which correlates with enhanced folate status. J Nutr 126:1505–1511
- Kullisaar T, Zilmer M, Mikelsaar M, Vihalemm T, Annuk H, Kairane C, Kilk A (2002) Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. Int J Food Microbiol 72:215–224
- Laiño JE, LeBlanc JG, Savoy de Giori GS (2012) Selection of folate producing starter cultures of yogurt isolated from Northwestern Argentina. Can J Microbiol 58:581–588
- Langa S, Maldonado A, Delgado S, Martín R, Martín V, Jiménez E, Ruiz-Barba JL, Mayo B, Connor RI, Suárez JE, Rodríguez JM (2012) Characterization of *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a strain isolated from human milk: from genotype to phenotype. Appl Microbiol Biotechnol 94:1279–1287
- Lara-Villoslada F, Sierra S, Díaz-Ropero MP, Rodríguez JM, Xaus J, Olivares M (2009) Safety assessment of *Lactobacillus fermentum* CECT5716, a probiotic strain isolated from human milk. J Dairy Res 76:216–221
- LeBlanc JG, Piard JC, Sesma F, de Giori GS (2005) *Lactobacillus fermentum* CRL 722 is able to deliver active alpha-galactosidase activity in the small intestine of rats. FEMS Microbiol Lett 248: 177–182
- LeBlanc JG, Giori GSD, Smid EJ, Hugenholtz J, Sesma F (2007) Folate production by lactic acid bacteria and other food-grade microorganisms. Commun Curr Res Educ Topics Trends Appl Microbiol 1:329–339
- LeBlanc JG, Ledue-Clier F, Bensaada M, de Giori GS, Guerekobaya T, Sesma F, Juillard V, Rabot S, Piard JC (2008) Ability of *Lactobacillus fermentum* to overcome host alpha-galactosidase deficiency, as evidenced by reduction of hydrogen excretion in rats consuming soya alpha-galacto-oligosaccharides. BMC Microbiol 8:22
- LeBlanc JG, Milani C, Savoy de Giori GS, Sesma F, van Sinderen D, Ventura M (2013) Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. Curr Opin Biotechnol 24:160–168
- Loguercio C, D'Argenio G, Delle Cave M, Cosenza V, Della Valle N, Mazzacca G, Del Vecchio BC (2003) Glutathione supplementation improves oxidative damage in experimental colitis. Dig Liver Dis 35:635–641
- Lu L, Hsieh M, Oriss TB, Morelf PA, Starzl TE, Rao AS, Thomson AW (1995) Generation of DC from mouse spleen cell cultures in response to GM-CSF: immunophenotypic and functional analyses. Immunology 84:127–134
- Maldonado J, Cañabate F, Sempere L, Vela F, Sánchez AR, Narbona E, López-Huertas E, Geerlings A, Valero AD, Olivares M, Lara-Villoslada F (2012) Human milk probiotic *Lactobacillus fermentum* CECT5716 reduces the incidence of gastrointestinal and upper respiratory tract infections in infants. J Pediatr Gastroenterol Nutr 54: 55–61
- Mañé J, Lorén V, Pedrosa E, Ojanguren I, Xaus J, Cabré E, Domènech E, Gassull MA (2009) *Lactobacillus fermentum* CECT5716 prevents and reverts intestinal damage on TNBS-induced colitis in mice. Inflamm Bowel Dis 15:1155–1163
- Martín R, Langa S, Reviriego C, Jimenez E, Marin ML, Xaus J, Fernández L, Rodríguez JM (2003) Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. J Pediatr 143:754–758
- Martín R, Olivares M, Marin ML, Fernandez L, Xaus J, Rodríguez JM (2005) Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. J Hum Lact 21:8–17
- Martín R, Olivares M, Marin ML, Xaus J, Fernández L, Rodríguez JM (2005) Characterization of a reuterin-producing *Lactobacillus coryniformis* strain isolated from a goat's milk cheese. Int J Food Microbiol 104:267–277
- Martín R, Olivares M, Pérez M, Xaus J, Torre C, Fernández L, Rodríguez JM (2010) Identification and evaluation of the probiotic potential of lactobacilli isolated from canine milk. Vet J 185:193–198
- Miralles-Barrachina O, Savoye G, Belmonte-Zalar L, Hochain P, Ducrotte P, Hecketsweiler B, Lerebours E, Dechelotte P (1999) Low levels of glutathione in endoscopic biopsies of patients with Crohn's colitis: the role of malnutrition. Clin Nutr 18:313–317
- Morita H, Toh H, Fukuda S, Horikawa H, Oshima K, Suzuki T, Murakami M, Hisamatsu S, Kato Y, Takizawa T, Fukuoka H, Yoshimura T, Itoh K, O'Sullivan DJ, McKay LL, Ohno H, Kikuchi J, Masaoka T, Hattori M (2008) Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production. DNA Res 15: 151–161
- Olivares M, Díaz-Ropero MP, Martín R, Rodríguez JM, Xaus J (2006) Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. J Appl Microbiol 101:72–79
- Olivares M, Díaz-Ropero MP, Sierra S, Lara-Villoslada F, Fonollá J, Navas M, Rodríguez JM, Xaus J (2007) Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. Nutrition 23:254–260
- Peran L, Camuesco D, Comalada M, Nieto A, Concha A, Adrio JL, Olivares M, Xaus J, Zarzuelo A, Galvez J (2006) *Lactobacillus fermentum*, a probiotic capable to release glutathione, prevents

- colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis. *Int J Colorectal Dis* 21:737–746
- Pérez-Cano FJ, Dong H, Yaqoob P (2010) *In vitro* immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk. *Immunobiology* 12:996–1004
- Piddock LJ (2006) Multidrug-resistance efflux pumps—not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* 4:629–636
- Santos F, Vera JL, van der Heijden R, Valdez G, de Vos WM, Sesma F, Hugenholtz J (2008) The complete coenzyme B12 biosynthesis gene cluster of *Lactobacillus reuteri* CRL1098. *Microbiology* 154:81–93
- Song Y-L, Kato N, Matsumiya Y, Liu C-X, Kato H, Watanabe K (1999) Identification of and hydrogen peroxide production by fecal and vaginal lactobacilli isolated from Japanese women and newborn infants. *J Clin Microbiol* 37:3062–3064
- Sybesma W, Starrenburg M, Tijsseling L, Hoefnagel MH, Hugenholtz J (2003) Effects of cultivation conditions on folate production by lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 69:4542–4548
- Taranto MP, Vera JL, Hugenholtz J, De Valdez GF, Sesma F (2003) *Lactobacillus reuteri* CRL1098 produces cobalamin. *J Bacteriol* 185:5643–5647
- Yap PS, Gilliland SE (2000) Comparison of newly isolated strains of *Lactobacillus delbrueckii* susp. *lactis* for hydrogen peroxide production at 5°C. *J Dairy Sci* 83:628–632
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 7:203–214

**VII. DESARROLLO DE UN QUESO FRESCO PROBIÓTICO
MEDIANTE EL EMPLEO DE DOS CEPAS DE *Lactobacillus*
salivarius AISLADAS DE LECHE HUMANA**

Artículo publicado en *BioMed Research International* (2014)

Research Article

Development of a Potential Probiotic Fresh Cheese Using Two *Lactobacillus salivarius* Strains Isolated from Human Milk

Nivia Cárdenas,^{1,2} Javier Calzada,³ Ángela Peirotén,³ Esther Jiménez,^{1,2} Rosa Escudero,¹ Juan M. Rodríguez,^{1,2} Margarita Medina,³ and Leónides Fernández^{1,2}

¹ Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria, Avenida Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

² Probisearch, 28760 Tres Cantos, Spain

³ Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, INIA, Carretera de La Coruña, km. 7.5, 28040 Madrid, Spain

Correspondence should be addressed to Leónides Fernández; leonides@ucm.es

Received 28 February 2014; Revised 24 April 2014; Accepted 1 May 2014; Published 29 May 2014

Academic Editor: Clara G. de los Reyes-Gavilán

Copyright © 2014 Nivia Cárdenas et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Cheeses have been proposed as a good alternative to other fermented milk products for the delivery of probiotic bacteria to the consumer. The objective of this study was to assess the survival of two *Lactobacillus salivarius* strains (CECT5713 and PS2) isolated from human milk during production and storage of fresh cheese for 28 days at 4°C. The effect of such strains on the volatile compounds profile, texture, and other sensorial properties, including an overall consumer acceptance, was also investigated. Both *L. salivarius* strains remained viable in the cheeses throughout the storage period and a significant reduction in their viable counts was only observed after 21 days. Globally, the addition of the *L. salivarius* strains did not change significantly neither the chemical composition of the cheese nor texture parameters after the storage period, although cheeses manufactured with *L. salivarius* CECT5713 presented significantly higher values of hardness. A total of 59 volatile compounds were identified in the headspace of experimental cheeses, and some *L. salivarius*-associated differences could be identified. All cheeses presented good results of acceptance after the sensory evaluation. Consequently, our results indicated that fresh cheese can be a good vehicle for the two *L. salivarius* strains analyzed in this study.

1. Introduction

Among all dairy products, cheese has the highest consumption rate worldwide because of its versatility. Fresh cheeses are usually not or minimally aged, have high moisture content, do not have a rind, and got very mild flavour and a soft and smooth texture. In this category, milk coagulation is due to rennet and/or acid produced from a bacterial culture or other sources such as lemon juice. When bacteria are involved in their manufacture, they also contribute to develop typical flavours, to improve quality, and/or to promote health benefits if they display probiotic properties [1].

Probiotics are defined as “live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host” [2], being *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* the most frequently used genera [3]. Yogurt and fermented milks are the most common foods for delivery

of probiotic bacteria, but some studies have found that their characteristics may compromise the viability of the probiotic strains [4–6]. Cheese may offer several advantages as a probiotic carrier due to its higher pH and fat content and harder consistency compared to fermented milks [7]. These features provide more protection to probiotics not only during cheese production, ripening, and storage, but also during the passage through the gastrointestinal tract, allowing bacteria to arrive in higher numbers at the target site after ingestion [7].

Several studies have confirmed that human milk is a source of live bacteria, mainly staphylococci and streptococci, but also contains lactic acid bacteria and bifidobacteria [8–11]. The lactobacilli species more frequently isolated from milk samples of healthy women are *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus gastricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus*

salivarius, and *Lactobacillus vaginalis* [12]. Some lactobacilli isolated from human milk have been characterized and shown to have probiotic potential [13–15]. Specifically, *L. salivarius* CECT5713 that was isolated from human milk and infant feces of a healthy mother-child pair has been shown to have remarkable probiotic potential because it had high rate of survival in simulated gastrointestinal tract conditions and strong adherence to mucus and intestinal cells *in vitro*, stimulated the expression of mucin-encoding genes, and produced antimicrobial compounds [14–17]. More recently, its complete genome has been sequenced [18], and its genetic features, such as proteins potentially involved in human molecular mimetism, may explain its immunomodulatory, anti-inflammatory, and anti-infectious properties [19, 20]. Moreover, its safety and health beneficial effects have been proved in animal models and in human clinical assays [20–23]. More recently, *L. salivarius* PS2 has also been isolated from human milk and preliminary assays have shown similar traits and probiotic potential.

The aim of this work was to evaluate the performance of these two human milk *L. salivarius* strains (CECT5713 and PS2) in fresh cheese in order to develop a probiotic cheese. The survival of these two *L. salivarius* strains in the cheese has been studied as well as their impact on chemical composition, volatile compounds, texture and other organoleptic properties, and overall consumer acceptance of the experimental cheeses.

2. Materials and Methods

2.1. Starter and Probiotic Organisms. *Lactococcus lactis* ESI153, originally isolated from artisanal raw milk cheese [24], was selected to be used as starter culture. *Lc. lactis* ESI153 cells were grown in M17 (Oxoid, Basinstoke, UK) broth supplemented with 0.5% (wt/vol) glucose (GM17) at 32°C. Before use, *Lc. lactis* ESI153 cells were subcultured (1%) into reconstituted at 11% (wt/vol) and heat-treated (121°C, 5 min) nonfat dry milk (HT-NFDM) and incubated overnight at 32°C.

Freeze-dried cultures of probiotic *L. salivarius* CECT5713 and PS2 were prepared as follows. A fully grown liquid culture on de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) (Oxoid) broth was centrifuged at 10000 ×g for 10 min at 4°C. The cell pellet was washed with 0.85% (wt/vol) NaCl and resuspended in HT-NFDM to one tenth of its original volume. The cell suspension was frozen at –80°C for 12 h in metal trays. Freeze drying was carried out at, first, 0°C for 24 h and, then, at 20°C for 24 h under 1.3 Pa in a Lyph-Lock Stoppering Tray Dryer model 77560 (Labconco Corporation, Kansas City, MO, USA). Freeze-dried cultures containing approximately 10.3 log₁₀ colony forming units (cfu)/g were vacuum packaged and stored at 4°C before use.

2.2. Experimental Cheese Manufacture. Cheeses were made from commercial pasteurized (high temperature short time, HTST) cow's milk (Ganadería Priégola SA, Villanueva del Pardillo, Madrid, Spain) following a laboratory-scale procedure described previously by Rodríguez et al. [25] and

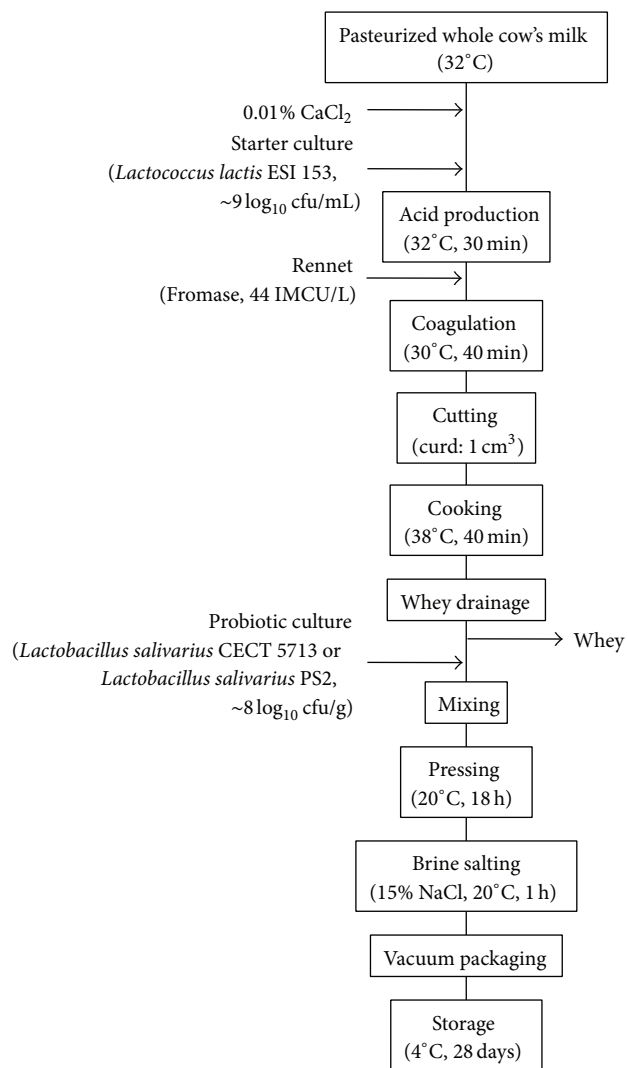


FIGURE 1: Flowchart of the cheese making process.

Reviriego et al. [26] with some modifications (Figure 1). Briefly, pasteurized milk (1.5 L/vat) at 32°C with 0.01% (wt/vol) CaCl₂ was inoculated with *Lc. lactis* ESI153 (approximately 9 log₁₀ cfu/mL) as starter culture. Rennet (Fromase, 44 IMCU/L; DSM Food Specialities, Seclin Cedex, France) was added to milk 30 min after the inoculation of *Lc. lactis* ESI153. Curds were cut 40 min after rennet addition and heated at 38°C for 40 min. Whey was drained off and freeze-dried *L. salivarius* CECT5713 or PS2 were added to the curd, to reach a final concentration of ~8 log₁₀ cfu/g before the curds were distributed into the molds. Control cheese was manufactured at the same conditions with the addition of the equivalent amount of HT-NFDM used as the excipient for freeze drying the lactobacilli strains. Cheeses were pressed for 16 h at room temperature and salted in 15% brine (wt/vol) during 3 h. The resulting cheeses (~190 g) were cut into pieces, which were individually vacuum-packed in Cryovac plastic bags and kept refrigerated at 4°C during 28 days. All cheese manufacturing trials were made in triplicate.

2.3. Gross Composition, pH, and Water Activity in Cheese. Cheese samples were analyzed for moisture (ISO 5534/IDF 004:2004), fat (ISO 1735/IDF 005:2004), protein (ISO 8968-1/IDF 020-1:2014), and ash content (AOAC 935.42). The pH value of a cheese slurry prepared by blending 20 g of grated cheese with 12 mL of water [27] was measured with a pH meter (Crison Digit-501). The water activity (a_w) was determined with a Decagon CX-1 hygrometer (Decagon, Pullman, Washington, USA). Determinations were made on triplicate samples.

2.4. Viable Bacterial Counts in Cheese. Viability of the *L. salivarius* strains was monitored in cheese samples at 0, 7, 14, 21, and 28 days at 4°C. For this purpose portions (10 g) of cheese were blended with 100 mL of 0.1% (wt/vol) sterile peptone water in a stomacher. Serial dilutions were made also in sterile peptone water and plated following the surface plate technique in appropriate media. *L. salivarius* strains were enumerated on de Man, Rogosa and Sharpe (MRS, Oxoid) agar containing 0.002% (wt/vol) of bromophenol blue after 24 h at 37°C under aerobic conditions. *Lc. lactis* ESI153 was enumerated on M17 (Oxoid) agar supplemented with 0.5% (wt/vol) glucose (GM17) after 24 h at 32°C under aerobic conditions. To confirm their identity, selected colonies were observed by optical microscopy to check their morphology and Gram staining and typed by Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) using primer OPL5 (5'-ACG CAG GCA C-3'), as described by Ruiz-Barba et al. [28]. Ten randomly chosen isolates sharing the same RAPD profile (only two different RAPD profiles were obtained) were subjected to Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) after digestion with *Sma*I following the procedure described by Martin et al. [12]. The absence of *Enterobacteriaceae* and *Bacillus cereus* in cheese samples was assessed by pouring onto MacConkey and PEMBA agar (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France), respectively, and incubation in aerobically conditions at 37°C for up to 48 h. Bacterial counts were recorded as the cfu/g of cheese and transformed to log₁₀ values before statistical analysis.

2.5. Isolation of Bacterial DNA and PCR-DGGE Analysis. Cheeses samples (5 g) were homogenized into sodium citrate (50 mL) using a stomacher (260 rpm × 1 min). Then, an aliquot of the mixture (10 mL) was centrifuged at 19,000 ×g during 5 min. The resulting pellet was used for the isolation of total bacterial DNA from each cheese sample following the protocol described previously by Moles et al. [29]. DNA yield was measured using a NanoDrop ND 1000 UV spectrophotometer (Nano-Drop Technologies, Wilmington, Delaware, USA) and was stored at -20°C until PCR DGGE analysis.

Primers U968-GC-f (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC-3') and L1401-r (5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3') [30] and Lab159f (5'-GGA AAC AGG TGC TAA TAC CG-3') and Uni-515-GCr (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAT CGT ATT ACC GCG CTG CTG GCA C-3') [31]

were used to amplify V6–V8 regions from 16S rRNA genes on bacterial DNA. The PCR reaction was performed in a total reaction volume of 50 µL containing 5× My Taq Red reaction buffer (Bioline, London, UK), My Taq Red DNA polymerase (Bioline), and 10 g/mL of the isolated DNA. The amplification program was as follows: 95°C for 2 min, 35 cycles of 95°C for 30 s, 56°C for 40 s, 72°C for 60 s, and then 72°C for 5 min. PCR products were stored at -20°C until use.

PCR fragments were separated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) using a DCode System (BioRad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA) and gels with a linear denaturant gradient of 30 to 50% as described by Martin et al. [32]. A DNA mixture made with equal amounts of amplicons from *L. salivarius* CECT5713 or PS2 and *Lc. lactis* ESI153 was used as a marker.

2.6. Analysis of Cheese Texture. Texture profile analysis (TPA) of the cheeses was performed in a texturometer TA-XT2i (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK). The texturometer was provided with a 0.2 N load cell and a 20 mm diameter probe at a crosshead speed of 5 mm/s to perform a uniaxial compression test in two consecutive compressions. Cheese samples were prepared by cutting 2 cm³ cubes, which were kept during 1 h at 25°C before performing the assay. The cheese cube was placed between the two parallel plates and compressed to 50% of its original height sample. TPA parameters (hardness, cohesiveness, adhesiveness, chewiness, gumminess, and springiness) were determined from the TPA two-compression force-time curve with the aid of the Texture Expert for Windows software, version 1.20 (Stable Micro Systems). All measurements were made in triplicate.

2.7. Colour Analysis. The colour of cheese samples was determined with a tristimulus colour analyzer (Minolta Chroma Meter CR300, Minolta Corporation, Ramsey, NJ, USA) that measures reflective colours. The measurement was made both on the surface and the core of cheese samples, and the results were expressed using the CIE $L^*a^*b^*$ (CIELAB) space. This three-dimensional model describes all the colours visible to the human eye by means of three spatial coordinates: a central vertical axis that represents lightness (L^*) in which values run from 0 (black) to 100 (white); a second perpendicular axis (a^*) that represents the red-green channel, where positive values indicate red and negative values indicate green; and the third perpendicular axis (b^*) that represents the opponent yellow-blue channel where positive values indicate yellow and negative values indicate blue. Therefore, each colour can be represented as a point in a three-dimensional space defined by its three parameters L^* , a^* , and b^* . All measurements were made in triplicate.

2.8. Analysis of Volatile Compounds. Cheese samples were wrapped in aluminium foil, vacuum-packed in Cryovac plastic bags, and frozen at -80°C until analysis. Volatile compounds were extracted by headspace solid-phase microextraction (SPME) and, then, analysed by gas chromatography-mass spectrometry GC-MS (HP6890-MSD HP 5973, Agilent, Palo Alto, CA, USA) according to the procedure described by

Lee et al. [33]. Cheese samples (10 g) were homogenized with anhydrous sodium sulphate (20 g) and 20 μ L of an aqueous solution containing cyclohexanone (1058 ppm) and camphor (1040 ppm) as internal standards using a mechanical grinder. Then, 5 g of this mixture was weighed in a 40 mL glass vial that was sealed with a polytetrafluoroethylene (PTFE) faced silicone septum. Volatile compounds were isolated using a SPME manual holder equipped with a 2 cm \times 50/30 μ m Stable Flex Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) coated fibre (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA). Vials were equilibrated in a thermostatic bath at 37°C for 20 min before the fiber was inserted through the PTFE septum for headspace extraction. The fiber was exposed to the headspace for 30 min, and then it was inserted into the GC injection port for desorption (260°C/10 min in splitless mode).

Separation of volatile compounds was performed on a Zebron ZB-WAX plus (60 m \times 0.25 mm \times 0.50 μ m) capillary column coated with 100% polyethylene glycol (Phenomenex, Torrance, California, USA). For chromatographic separation, the temperature was maintained at 40°C for 7 min, increased from 40°C to 90°C at a rate of 2°C/min, from 90°C to 150°C at a rate of 3°C/min, from 150°C to 240°C at a rate of 9°C/min and, finally, held at 240°C for 8 min. Detection was performed with the mass selective detector operating in the scan mode, collecting data at a rate of 5.16 scans/s over a range of 33–300 m/z at ionization energy of 70 eV. Identification of volatile compounds was based on comparison of spectra using the Wiley 275 Library (Wiley and Sons Inc., New York, USA). Relative abundances of compounds were expressed as percentages of their peak areas to the cyclohexanone peak area. Samples were tested in duplicate.

2.9. Sensory Evaluation. The sensory evaluation of cheeses was done by panellists (staff and students of the Department of Food Science and Nutrition, Universidad Complutense de Madrid) who were familiar with sensory evaluation techniques. The evaluation was performed in individual booths under controlled conditions of environment and light.

Representative cheese samples (~20 g) after 28 d of storage at 4°C were equilibrated at room temperature and presented to the tester in disposable plastic containers, except for odour assessment for which samples were presented in closed glass flasks. Samples were codified with random 3 digit numbers following a completely randomized block design. Cheese portions from replications of the same batch were mixed, so a representative sample was presented to the panellists.

Initially, 30 tester semitrained panellists participated in a triangle test to determine if potential probiotic cheeses containing lactobacilli differ in any aspect from the control cheese. Significant differences were determined using the method of Roessler et al. [34]. Later on, 18 selected trained panellists were asked to perform a descriptive test for a number of specific descriptors clustered in groups related to odour (buttery, cow, fermented milk, floral, fruity, lawn, rancid, and vinegar), flavour and taste (aftertaste, astringent, bitter, cow, fermented milk, fruity, salty, and vinegar), and texture

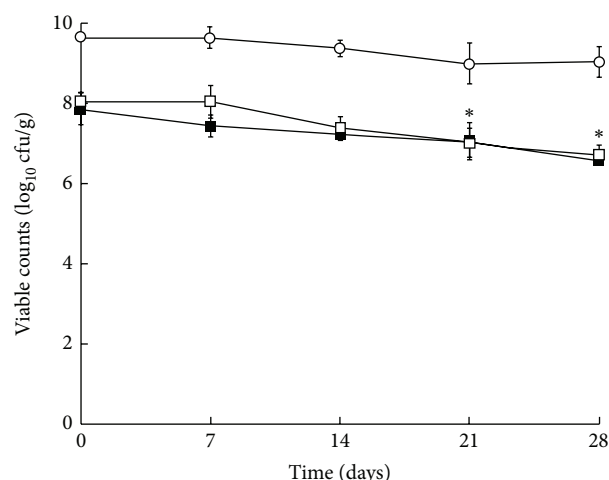


FIGURE 2: Viable counts (\log_{10} cfu/g) of starter *Lc. lactis* ESI153 (○) and *L. salivarius* CECT5713 (□) and PS2 (■) in fresh cheese during storage at 4°C.

and appearance (adhesive, bright, colour (white or yellow), creamy, friable, hardness, moist, springy, and smooth) and to score for the overall impression using a 10-point intensity scale.

2.10. Statistical Analysis. The influence of the addition of *L. salivarius* CECT5713 and PS2 to cheeses was analyzed by one way analysis of variance (ANOVA). Tukey's multiple range tests were applied to determine differences among the cheeses. Differences were considered significant at $P < 0.05$. StatGraphics Centurion XVI version 16.1.15 (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, Virginia, USA) was used to perform these analyses.

3. Results

3.1. Gross Composition, pH, and Water Activity. The mean composition of control cheeses without the addition of probiotic bacteria was 24.5% (wt/wt) fat, 17.8% (wt/wt) protein, and 3.1% (wt/wt) ash after 28 days of storage at 4°C (Table 1). Chemical composition of cheeses manufactured with *L. salivarius* CECT5713 or PS2 was similar; slightly higher moisture and lower fat and protein contents were found compared to control cheeses, although the difference was statistically significant only for the protein content. The presence of lactobacilli in cheeses was associated with a lower final pH compared to control cheeses, but it did not modify the a_w of the final product (0.96-0.97).

3.2. Viability of *L. salivarius* during Cheese Storage. The growth of *L. salivarius* CECT5713 and PS2 in MRS agar containing bromophenol produced large and blue colonies, while in the same conditions *Lc. lactis* ESI153 colonies were small and white. Initial viable counts in MRS agar of *L. salivarius* CECT5713 and PS2, according to the morphology of the colony, were 8.1 and 7.9 \log_{10} cfu/g, respectively (Figure 2). Both *L. salivarius* strains remained viable in the cheeses after

TABLE 1: Chemical composition, pH, and water activity of control cheese and cheeses using *L. salivarius* CECT5713 or PS2 after 28 days of storage at 4°C*.

	Cheese			P value**
	Control	<i>L. salivarius</i> CECT5713	<i>L. salivarius</i> PS2	
Moisture (% wt/wt)	52.48 ± 2.14	56.17 ± 1.95	56.62 ± 1.96	0.086
Fat (% wt/wt)	24.47 ± 1.30	20.88 ± 1.84	22.37 ± 1.27	0.067
Protein (% wt/wt)	17.75 ± 0.80 ^a	14.94 ± 0.79 ^b	15.43 ± 0.85 ^b	0.012
Ash (% wt/wt)	3.10 ± 0.11	3.28 ± 0.45	2.88 ± 0.10	0.278
pH	4.86 ± 0.13	4.71 ± 0.03	4.75 ± 0.11	0.287
a_w	0.96 ± 0.01	0.96 ± 0.01	0.97 ± 0.01	0.398

*Results are expressed as mean ± standard deviation values of triplicate samples; **one-way ANOVA to determine differences on chemical composition, pH, and a_w between cheeses. ^{a,b}Mean values within the same row followed by different letter were significantly different when compared using the Tukey's test.

TABLE 2: Texture profile analysis of control and experimental cheeses using *L. salivarius* CECT5713 or PS2 after 28 days of storage at 4°C*.

Parameter	Cheese			P value**
	Control	<i>L. salivarius</i> CECT5713	<i>L. salivarius</i> PS2	
Hardness (N)	21.00 ± 0.71 ^a	24.42 ± 0.97 ^b	21.27 ± 0.65 ^a	0.001
Cohesiveness	0.15 ± 0.03	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.662
Adhesiveness (N s)	-0.57 ± 0.30	-0.77 ± 0.09	-0.57 ± 0.04	0.236
Springiness (m)	0.0048 ± 0.0015	0.0043 ± 0.0017	0.0048 ± 0.0010	0.851
Gumminess (N)	3.22 ± 0.64	3.61 ± 0.23	2.99 ± 0.29	0.171
Chewiness (N m)	0.015 ± 0.004	0.014 ± 0.005	0.013 ± 0.001	0.927

*Texture parameters are expressed as mean ± standard deviation values of quadruplicate measurements in triplicate samples; **one-way ANOVA to determine differences on texture parameters between cheeses. ^{a,b}Mean values within the same row followed by different letter were significantly different when compared using the Tukey's test.

28 days at 4°C (Figure 2). The probiotic counts decreased during storage, but the reduction in viable counts was significant only after 21 days. Final concentrations of *L. salivarius* CECT5713 and PS2 were 6.7 and 6.6 log₁₀ cfu/g, respectively, representing about a 1.3 log₁₀-unit reduction at the end of 28-day storage. The identity of selected colonies isolated at the end of the storage period was confirmed by RAPD and PFGE (results not shown). On the other hand, initial viable counts of the starter culture *Lc. lactis* ESI153 were higher (about 9 log₁₀ cfu/g in all cheese samples) and remained fairly constant along the storage period. Bacterial growth was not detected on PEMBA and MacConkey agar plates, confirming the absence of contamination with *B. cereus* and *Enterobacteriaceae*.

3.3. PCR DGGE Analysis. DGGE analysis was also performed in order to check the bacterial diversity and to confirm the presence of the probiotic strains' DNA in the cheese samples (Figure 3). The amplification of the V6–V8 variable region of the 16S rRNA gene of *L. salivarius* CECT5713 and *Lc. lactis* ESI153 using the primers U968-GC-f and L1401-r resulted in a single fragment differing in size for each bacterial species (Figure 3(a)). The same primer pair did not amplify any fragment when *L. salivarius* PS2 DNA was used as template. However, amplification of one fragment corresponding to the V6–V8 variable region of the 16S rRNA gene of *L. salivarius* PS2 was successful when *Lactobacillus*-specific primers (Lab159f and Uni-515-GCr) were used (Figure 3(b)). The DGGE profile obtained from *L. salivarius* PS2 using

this pair of primers comprised 3 dominant bands and it was different from the one obtained for *Lc. lactis* ESI153.

The DGGE profiles of cheese samples analyzed and the ladders constructed in this study (with amplicons obtained from pure cultures of *Lc. lactis* ESI153 and the corresponding *L. salivarius* strain), using universal or *Lactobacillus*-specific primers, were identical (Figure 3). This result indicates that the inoculated strains were the predominant in the respective cheeses during storage.

3.4. Textural Analysis of Cheeses. Texture parameters at the end of the cheese storage were similar in control and *L. salivarius*-containing cheeses (Table 2). No significant differences were observed in cohesiveness, adhesiveness, springiness, gumminess, and chewiness values. Globally, cheeses had a crumbly and brittle texture requiring only a relatively small load to fracture. However, cheeses manufactured with *L. salivarius* CECT5713 presented significantly higher values of hardness compared to control cheeses and cheeses containing *L. salivarius* PS2.

3.5. Colour Analysis. The colour was measured both on the surface and the core of cheese samples by tristimulus reflectance measurement (Table 3). In general, all samples had high lightness (L^* ~ 92 to 94), indicating no differences in the mechanical openings exhibited by the three cheeses, low yellow (b^* ~ 11 to 12), and very low green (a^* ~ -1 to -2) colour. Globally, the lightness value was lower in the surface than in the interior, possibly reflecting a closer structure in

TABLE 3: Colour parameters (L^* , a^* , and b^*) of control and experimental cheeses manufactured with *L. salivarius* CECT5713 or PS2 after 28 days of storage at 4°C[†].

Parameter	Cheese			<i>P</i> value ^{††}
	Control	<i>L. salivarius</i> CECT5713	<i>L. salivarius</i> PS2	
Surface				
L^*	92.20 ± 0.90	92.67 ± 0.56	92.41 ± 0.12	0.664
a^*	-1.58 ± 0.02 ^a	-1.16 ± 0.04 ^b	-1.33 ± 0.11 ^c	0.001
b^*	11.66 ± 0.41 ^a	10.74 ± 0.16 ^b	11.92 ± 0.26 ^a	0.006
Core				
L^*	93.13 ± 0.57	93.29 ± 0.08	93.81 ± 0.46	0.202
a^*	-1.44 ± 0.09 ^a	-1.48 ± 0.12 ^{ab}	-1.70 ± 0.04 ^b	0.024
b^*	10.75 ± 0.17	10.69 ± 0.21	10.92 ± 0.34	0.521

[†] Colour parameters are expressed as mean ± standard deviation values of quadruplicate measurements in triplicate samples; ^{††} one-way ANOVA to determine differences on colour parameters between cheeses. ^{a,b,c} Means values within the same row followed by different letter were significantly different when compared using the Tukey's test.

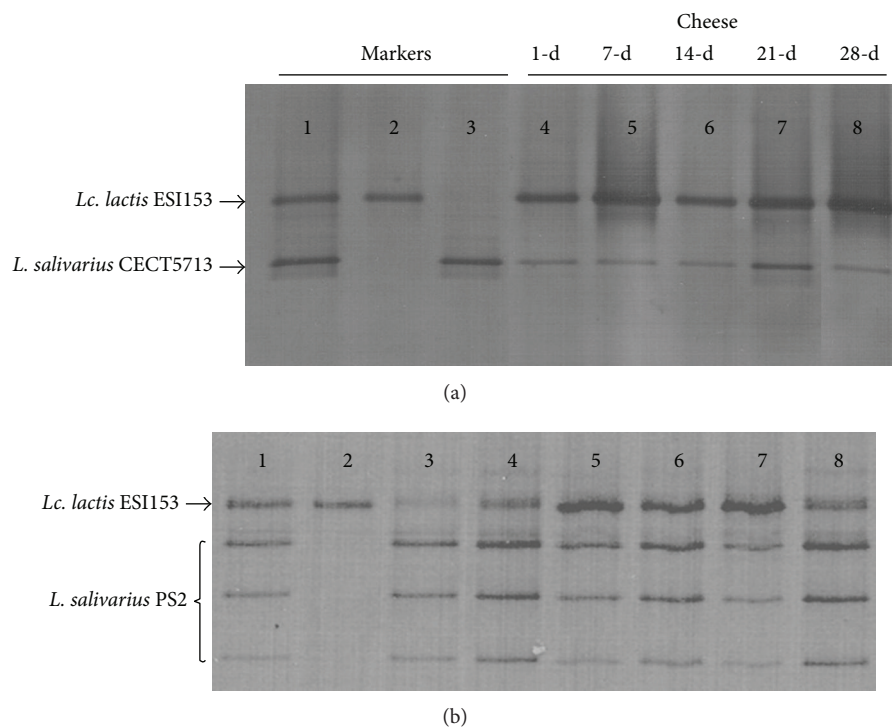


FIGURE 3: DGGE profiles of 16S rRNA gene V6–V8 regions obtained from samples of cheese manufactured with *L. salivarius* CECT5713 using universal primers U968-GC-f and L1401-r (a) and *L. salivarius* PS2 using *Lactobacillus*-specific primers Lab159f and Uni-515-GCr (b) during storage at 4°C. (a): lane 1: marker (*L. salivarius* CECT5713 and *Lc. lactis* ESI153); lane 2: *Lc. lactis* ESI153; lane 3: *L. salivarius* CECT5713; lane 4: 1-day cheese; lane 5: 7-day cheese; lane 6: 14-day cheese; lane 7: 21-day cheese; lane 8: 28-day cheese. (b) Lane 1: marker (*L. salivarius* PS2 and *Lc. lactis* ESI153); lane 2: *Lc. lactis* ESI153; lane 3: *L. salivarius* PS2; lane 4: 1-day cheese; lane 5: 7-day cheese; lane 6: 14-day cheese; lane 7: 21-day cheese; lane 8: 28-day cheese.

the surface and more open pores in the interior. The opposite was observed for b^* parameter, indicating more yellowness in the surface. The surface of cheeses elaborated with *L. salivarius* CECT5713 was whiter and had less intense green colour than the others (Table 3).

3.6. Volatile Analysis. A total of 59 volatile compounds were identified in the headspace of experimental cheeses, including aldehydes, ketones, alcohols, esters, alkanes, and carboxylic and fatty acids (Table 4). All cheese samples presented high relative abundance of the alcohols 3-methyl-1-butanol

TABLE 4: Volatile compounds in control cheese and cheeses containing *L. salivarius* CECT5713 or PS2 after 28 days at 4 °C*.

Volatile compound	RT**	Cheese			P value***
		Control	<i>L. salivarius</i> CECT5713	<i>L. salivarius</i> PS2	
Aldehydes					
3-Methylbutanal	12.42	2.82 ± 0.15 ^a	0.98 ± 0.14 ^b	1.62 ± 0.25 ^c	0.000
Hexanal	23.21	0.64 ± 0.24	0.50 ± 0.07	0.56 ± 0.06	0.552
Ketones					
2-Butanone	8.01	3.66 ± 0.28	2.25 ± 0.39	2.64 ± 0.86	0.101
2-Propanone	11.58	16.85 ± 1.99 ^a	15.00 ± 1.36 ^a	21.39 ± 1.08 ^b	0.001
2-Heptanone	30.78	4.02 ± 0.16 ^a	1.89 ± 0.29 ^b	2.09 ± 0.09 ^b	0.000
3-Hydroxy-2-butanone	38.08	2.14 ± 0.36	1.91 ± 1.46	0.98 ± 0.31	0.413
Alcohols					
Ethanol	13.76	45.05 ± 2.86	47.95 ± 3.96	50.79 ± 3.01	0.212
3-Methyl-1-butanol	32.89	348.48 ± 6.49	358.80 ± 12.98	368.84 ± 20.33	0.375
2-Furanmethanol	55.59	0.87 ± 0.06	0.11 ± 0.05	0.52 ± 0.49	0.217
3-Methyl-3-buten-1-ol	35.71	1.04 ± 0.03	1.04 ± 0.10	1.18 ± 0.14	0.138
Esters					
Ethyl acetate	10.93	0.71 ± 0.01	0.65 ± 0.20	0.69 ± 0.15	0.905
Ethyl butanoate	20.02	0.55 ± 0.19	1.00 ± 0.22	1.06 ± 0.21	0.110
Ethyl hexanoate	34.41	0.34 ± 0.03	0.51 ± 0.11	0.54 ± 0.15	0.221
Alkanes					
2-Methylpentane	4.33	0.31 ± 0.04	0.35 ± 0.06	0.50 ± 0.17	0.200
3-Methylpentane	4.44	0.25 ± 0.02	0.34 ± 0.06	0.47 ± 0.15	0.073
Hexane	4.51	1.82 ± 0.36	1.82 ± 0.46	1.80 ± 0.64	0.998
Heptane	5.40	0.72 ± 0.01	0.65 ± 0.19	0.40 ± 0.09	0.064
2,4-Dimethylheptane	7.55	1.32 ± 0.05 ^a	0.40 ± 0.09 ^b	0.40 ± 0.15 ^b	0.001
4-Methyloctane	9.30	0.83 ± 0.04	0.20 ± 0.03	0.28 ± 0.18	0.113
Carboxylic and fatty acids					
Acetic acid	46.78	22.76 ± 1.02 ^a	42.61 ± 2.37 ^b	33.53 ± 8.62 ^{ab}	0.016
Propanoic acid	50.93	0.07 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00	
Butanoic acid	54.47	20.36 ± 1.80	28.23 ± 2.99	26.15 ± 6.26	0.209
Hexanoic acid	59.58	14.82 ± 0.99	22.49 ± 3.51	20.04 ± 4.14	0.110
Octanoic acid	62.89	7.42 ± 2.30	13.80 ± 3.86	10.85 ± 2.04	0.133
Heptanoic acid	61.33	0.48 ± 0.01	0.62 ± 0.09	1.08 ± 0.44	0.083
Nonanoic acid	64.46	1.35 ± 0.19	0.73 ± 0.26	6.58 ± 8.90	0.362
Decanoic acid	66.21	3.15 ± 1.89	5.66 ± 3.18	3.29 ± 1.27	0.401
Others					
D-Limonene	31.78	0.74 ± 0.02	1.18 ± 0.13	0.72 ± 0.47	0.163

* Relative abundance of compounds was expressed as percentages of their peak areas to the cyclohexanone peak area; ** RT: retention time; *** one-way ANOVA to determine differences on the relative abundance of volatile compounds between cheeses. ^{a,b,c} Mean values within the same row followed by different letter were significantly different when compared using the Tukey's test.

and ethanol as well as of acetic, butanoic, and hexanoic acids, although significant differences were observed only for acetic acid that had higher abundance in cheeses containing *L. salivarius* CECT5713. Aldehyde 3-methylbutanal, ketone 2-heptanone, and alkane 2,4-dimethylheptane were present at statistically significant lower levels in cheeses manufactured with *L. salivarius* than in control cheese. Level of 2-propanone was higher in cheese made with *L. salivarius* PS2 than in the other two cheeses.

3.7. Sensory Evaluation. The results of the triangle test to evaluate differences in sensory properties indicated that significant differences were detected at the end of the storage. The panellists could appreciate significant variations between control cheese and cheese manufactured with *L. salivarius* CECT5713 ($P = 0.018$) or PS2 ($P = 0.002$).

Trained panellists performed a quantitative descriptive analysis using attributes describing odour, flavour, taste, texture, and appearance of cheeses after 28 days of storage at 4 °C

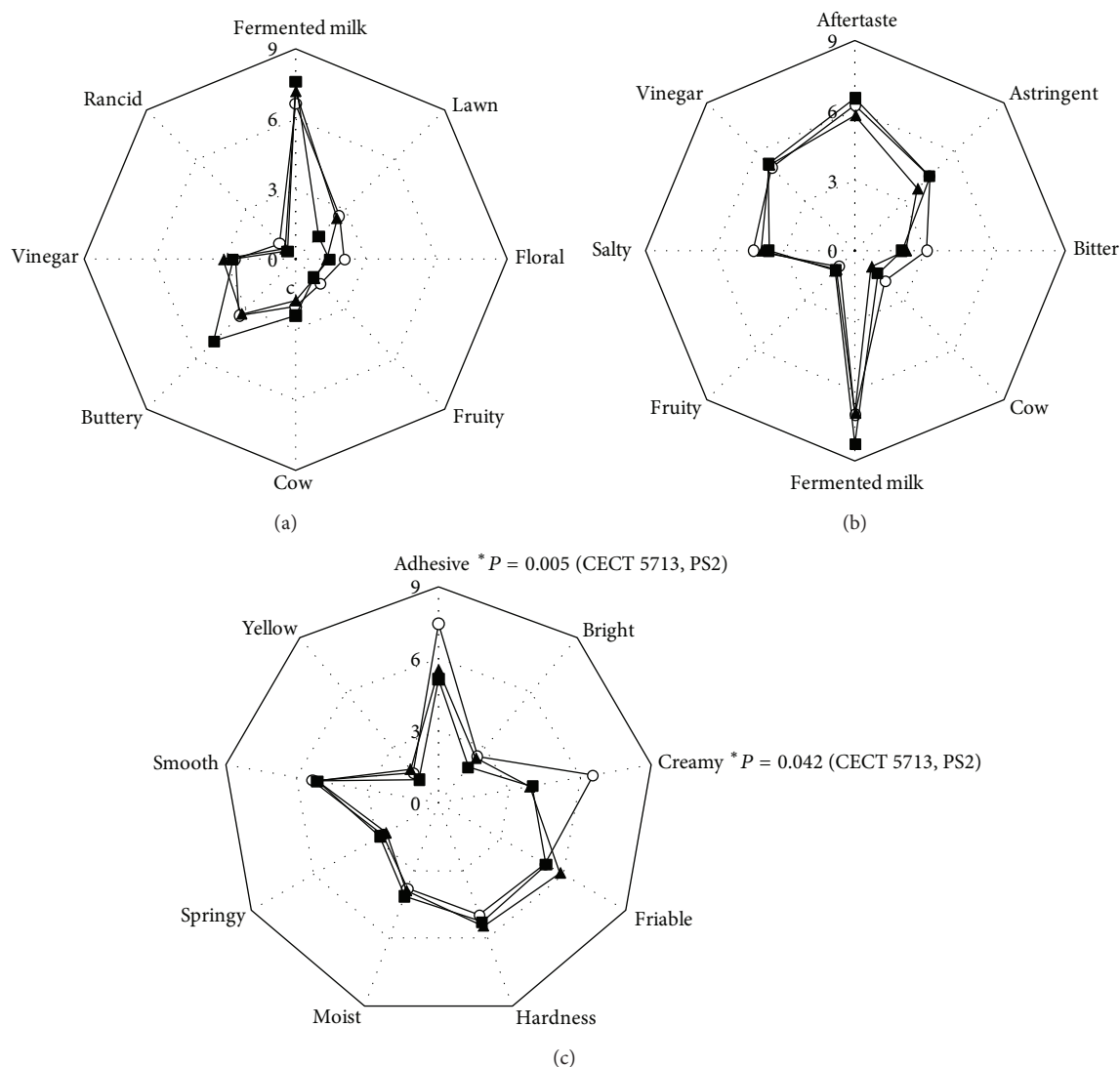


FIGURE 4: Graphical charts of the sensory profile of control cheese (O) and cheeses containing *L. salivarius* CECT5713 (■) and PS2 (▲) after 28 days at 4°C. (a) Odour related attributes. (b) Flavour and taste related attributes. (c) Texture and appearance descriptors.

(Figure 4). Globally, the descriptors that obtained the highest scores were fermented milk taste and smell and butter-like smell. Among all attributes, only the intensity of adhesiveness and creaminess in control cheese was statistically higher than that of the cheeses containing *L. salivarius* CECT5713 or PS2. However, these differences did not have any statistically significant effect on the overall quality of the cheeses ($P < 0.05$), and all cheese samples presented good results of acceptance after 28 days of storage at 4°C. In average, the acceptance level of odour, flavour, appearance, and texture, as well as the global score, was up to 6 (on a 0–10 numeric rating scale) in the three types of cheese.

4. Discussion

Cheese has been considered as an excellent alternative to fermented milk and yogurts as a food vehicle for probiotic delivery. Its buffering capacity is one of its advantages because

it protects probiotics against the highly acidic stomach environment. The structure of the gel and its high fat content and solid consistency also add to the probiotic protection [35, 36]. Several studies have demonstrated that cheese is an excellent carrier for probiotic bacteria, including fresh and Cheddar cheese varieties [5, 27, 36–38]. However, variable results have been obtained with different probiotic strains and each strain should be tested individually. Therefore, the objective of this study was to check the viability of two lactobacilli strains isolated from human milk after their incorporation to cheese curds and to test their impact in the final product.

Theoretically, the probiotic bacteria could be added either directly to milk and/or incorporated at a later stage during the manufacture of cheese. Ong et al. [36] manufactured probiotic Cheddar cheese containing different combinations of six probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains which were cocultured with the cheese starter culture. They reported some loss of probiotic lactobacilli and bifidobacteria in whey

(about 6-7 log₁₀ cfu/g), but final counts in all fresh cheeses were high and acceptable (8-9 log₁₀ cfu/g). In preliminary trials, following our procedure, *L. salivarius* CECT5713 and PS2 were also cocultured with the starter culture, but only a small amount of probiotic was retained in the curd, resulting in a high loss of lactobacilli in the cheese whey (results not shown). Notably, the addition of the probiotic lactobacilli to the curds after whey drainage, when most of the whey had been removed and before molding, resulted in improved retention of lactobacilli in the cheese.

In any probiotic food, in order to have industrial application and to exert its health benefit to the host, the incorporated probiotic strain must maintain its viability during the manufacture, through the shelf life of the product and up to the time of consumption. In the present study, both *L. salivarius* strains remained viable in the experimental cheeses after 28 days at 4°C. In addition, the hygienic quality of the final product was adequate and growth of any other bacteria was not detected in the culture media used. Antibacterial properties against pathogenic bacteria have been reported for *L. salivarius* CECT5713 due to the production of antimicrobial compounds such as lactate, acetate, and hydrogen peroxide [14]. This strain also harbors a bacteriocin cluster located in a megaplasmid that contains several genes that would allow the biosynthesis of several bacteriocins, but a deletion at the beginning of the regulatory system results in the absence of any bacteriocin production [19].

A minimum probiotic daily dose of 10⁸-10⁹ cfu has been recommended in processed foods in order to exert their beneficial effects [35, 39]. This would be equivalent to a daily intake of 100 g of product containing 10⁶-10⁷ cfu/g. The results obtained in this study show that the counts of *L. salivarius* CECT5713 and PS2 in cheeses were always in the range of this recommended level. Therefore, they would satisfy this criteria established for a probiotic food. Furthermore, the presence of these potentially probiotic bacteria did not interfere with the performance of starter lactococci, as it has been described by other authors [27].

Another challenge associated with the addition of probiotic bacteria during cheese manufacturing is to maintain the characteristics of the cheese. Actually, consumers demand the addition of probiotic cultures to many foods, including cheese, but a primary consideration is that the sensory properties, especially taste, of any probiotic food should be appealing [40]. The addition of certain levels of any viable bacteria, and their enzymes, to cheese most probably will contribute to glycolysis, proteolysis, and lipolysis processes that take place during manufacture and cheese ripening and contribute to the organoleptic properties of the final product [41]. In order to maintain an adequate organoleptic quality, probiotic bacteria must not adversely affect cheese composition, texture, flavour, and final acceptance. The addition of probiotic *L. salivarius* CECT5713 and PS2 did not result in a substantial change of the fresh cheese composition, which was within the gross chemical composition of this type of cheeses.

A slight (but not statistically significant) increase in moisture content of cheeses containing lactobacilli compared

to control cheese was noted, although *a_w* values remained unchanged. These differences may be related, at least in part, to several factors during cheese manufacture that exert a great influence on moisture retention in the curd such as cutting intensity, final size of the curds, or curd manipulation [42]. On the other hand, exopolysaccharide- (EPS-) producing lactic acid bacteria have been reported to increase moisture retention in cheese [43-45] and could improve the texture of reduced-fat cheese that tends to be tough and rubbery. Two gene clusters for EPS biosynthesis have been described in *L. salivarius* strains, although it has been reported that the level of production of EPS does not correlate with the presence of these clusters, depends on the available carbohydrate, and is highly strain-dependent [46]. However, at present it is not known if *L. salivarius* CECT5713 and PS2 are EPS-producing strains. Another tentative explanation may involve microbial dynamics and metabolism. It has been reported that cheese microbiota and its metabolic activity may confound the effect of moisture on *a_w* [47]. Changes in the type and concentration of low molecular weight soluble compounds, such as an increase in lactate, free fatty acids, amino acids, and, even, very small peptides, might decrease the value of *a_w*, although this effect is usually more pronounced for ripened cheeses [47, 48].

Among the texture parameters analyzed in this work, instrumental methods only detected differences in hardness, which was higher in cheeses containing *L. salivarius* CECT5713 than in control cheeses and those manufactured with *L. salivarius* PS2. However, this difference was not perceived by panellists during the descriptive test, indicating that it did not have a relevant impact in the sensory quality and acceptance of the cheese. On the contrary, the panellists identified both cheeses containing probiotic lactobacilli as having lower adhesiveness than the control cheese, although the texture profile analysis did not reveal a statistically significant difference. Reduction in adhesiveness in cheeses made with an EPS-producing *Streptococcus thermophilus* culture has been related to the production and liberation of EPS [49, 50]. Also, a higher perception of creaminess in control cheese was reported in contrast to cheeses manufactured with *L. salivarius* CECT5713 and PS2. Creaminess is often related to a high fat level and the presence of fat globules, in agreement with the slightly higher fat content of control cheese, although sensorial discrimination of fat levels in solid foods is more difficult than in liquid products [51]. Regarding colour, small although statistically significant differences were also detected when using instrumental methods of analysis, but they were not perceived by the trained panellists. This indicates that the presence of probiotic lactobacilli did not disturb the distinctive white colour of fresh cheese.

Following the general component balance theory, cheese flavour is the result of a synergistic effect of the appropriate and balanced blend of various flavour compounds produced from proteins, lipids, and lactose through numerous biochemical reactions involving enzymes from milk, rennet, starter cultures, secondary cheese microbiota, and, even, spontaneous reactions [52]. The volatile composition of the cheese made with both *L. salivarius* strains was not qualitatively different from that of the control cheese, and only a

few quantitative differences were observed. The main change detected was a higher acetic acid concentration in the cheeses containing *L. salivarius* CECT5713 and PS2, probably related to higher lactose degradation during cheese storage which will explain a lower final pH in the probiotic cheese. However, these differences did not impact the sensory perception given by the panellists or the global acceptance of the cheeses manufactured with *L. salivarius* CECT5713 and PS2, as it has been described with other probiotic strains by other authors [36–38, 49, 50, 53].

5. Conclusion

The results of the present study demonstrate that *L. salivarius* CECT5713 and PS2 incorporated into fresh cheese survived at adequate levels during a 28-day storage at 4°C. The presence of the lactobacilli did not interfere with normal growth of starter culture and did not modify significantly the composition and organoleptic properties of the probiotic cheeses containing *L. salivarius* strains that had good acceptance by trained panellists.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This work was supported by CSD2007-00063 (FUN-C-FOOD, Consolider-Ingenio 2010) and AGL2010-15420 Projects from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain).

References

- [1] A. R. Hill and P. Kethireddipalli, "Dairy products: cheese and yogurtin," in *Biochemistry of Foods*, N. A. M. Eskin and F. Shahidi, Eds., pp. 319–362, Elsevier Science & Technology Books, San Diego, Calif, USA, 3rd edition, 2012.
- [2] FAO/WHO, "Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria," Technical Report, FAO/WHO, Geneva, Switzerland, 2001.
- [3] M. Sharma and M. Devi, "Probiotics: a comprehensive approach toward health foods," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 54, no. 4, pp. 537–552, 2014.
- [4] M. E. Sanders and M. L. Marco, "Food formats for effective delivery of probiotics," *Annual Review of Food Science and Technology*, vol. 1, pp. 65–85, 2010.
- [5] C. G. Vinderola, W. Prosello, D. Ghiberto, and J. A. Reinheimer, "Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian Fresco cheese," *Journal of Dairy Science*, vol. 83, no. 9, pp. 1905–1911, 2000.
- [6] E. W. Ng, M. Yeung, and P. S. Tong, "Effects of yogurt starter cultures on the survival of *Lactobacillus acidophilus*," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 145, no. 1, pp. 169–175, 2011.
- [7] C. Stanton, G. Gardiner, P. B. Lynch, J. K. Collins, G. Fitzgerald, and R. P. Ross, "Probiotic cheese," *International Dairy Journal*, vol. 8, no. 5–6, pp. 491–496, 1998.
- [8] R. Martín, S. Langa, C. Reviriego et al., "Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut," *Journal of Pediatrics*, vol. 143, no. 6, pp. 754–758, 2003.
- [9] M. P. Heikkilä and P. E. J. Saris, "Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 95, no. 3, pp. 471–478, 2003.
- [10] R. Martín, E. Jiménez, H. Heilig et al., "Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 75, no. 4, pp. 965–969, 2009.
- [11] T. Jost, C. Lacroix, C. Braegger, and C. Chassard, "Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches," *British Journal of Nutrition*, vol. 110, no. 7, pp. 1253–1262, 2013.
- [12] V. Martín, A. Maldonado, L. Moles et al., "Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces," *Journal of Human Lactation*, vol. 28, no. 1, pp. 36–44, 2012.
- [13] R. Martín, M. Olivares, M. L. Marín, L. Fernández, J. Xaus, and J. M. Rodríguez, "Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk," *Journal of Human Lactation*, vol. 21, no. 1, pp. 8–17, 2005.
- [14] R. Martín, E. Jiménez, M. Olivares et al., "*Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 112, no. 1, pp. 35–43, 2006.
- [15] M. Olivares, M. P. Díaz-Ropero, R. Martín, J. M. Rodríguez, and J. Xaus, "Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 101, no. 1, pp. 72–79, 2006.
- [16] M. P. Díaz-Ropero, R. Martín, S. Sierra et al., "Two *Lactobacillus* strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 102, no. 2, pp. 337–343, 2007.
- [17] F. J. Pérez-Cano, H. Dong, and P. Yaqoob, "In vitro immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk," *Immunobiology*, vol. 215, no. 12, pp. 996–1004, 2010.
- [18] E. Jiménez, R. Martín, A. Maldonado et al., "Complete genome sequence of *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a probiotic strain isolated from human milk and infant feces," *Journal of Bacteriology*, vol. 192, no. 19, pp. 5266–5267, 2010.
- [19] S. Langa, A. Maldonado-Barragán, S. Delgado et al., "Characterization of *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a strain isolated from human milk: from genotype to phenotype," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 94, no. 5, pp. 1279–1287, 2012.
- [20] E. Jiménez, L. Fernández, A. Maldonado et al., "Oral Administration of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, no. 15, pp. 4650–4655, 2008.
- [21] F. Lara-Villoslada, S. Sierra, M. P. Díaz-Ropero, M. Olivares, and J. Xaus, "Safety assessment of the human milk-isolated probiotic

- Lactobacillus salivarius* CECT5713,” *Journal of Dairy Science*, vol. 90, no. 8, pp. 3583–3589, 2007.
- [22] R. Arroyo, V. Martín, A. Maldonado, E. Jiménez, L. Fernández, and J. M. Rodríguez, “Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of lactobacilli isolated from breast milk,” *Clinical Infectious Diseases*, vol. 50, no. 12, pp. 1551–1558, 2010.
- [23] J. Maldonado, F. Lara-Villoslada, S. Sierra et al., “Safety and tolerance of the human milk probiotic strain *Lactobacillus salivarius* CECT5713 in 6-month-old children,” *Nutrition*, vol. 26, no. 11-12, pp. 1082–1087, 2010.
- [24] T. M. Cogan, M. Barbosa, E. Beuvier et al., “Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products,” *Journal of Dairy Research*, vol. 64, no. 3, pp. 409–421, 1997.
- [25] E. Rodríguez, J. Calzada, J. L. Arqués, J. M. Rodríguez, M. Nuñez, and M. Medina, “Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese,” *International Dairy Journal*, vol. 15, no. 1, pp. 51–57, 2005.
- [26] C. Reviriego, L. Fernández, and J. M. Rodríguez, “A food-grade system for production of pediocin PA-1 in nisin-producing and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains: application to inhibit *Listeria* growth in a cheese model system,” *Journal of Food Protection*, vol. 70, no. 11, pp. 2512–2517, 2007.
- [27] L. Ong, A. Henriksson, and N. P. Shah, “Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* or *Bifidobacterium* sp,” *International Dairy Journal*, vol. 17, no. 1, pp. 67–78, 2007.
- [28] J. L. Ruiz-Barba, A. Maldonado, and R. Jiménez-Díaz, “Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications,” *Analytical Biochemistry*, vol. 347, no. 2, pp. 333–335, 2005.
- [29] L. Moles, M. Gómez, H. Heilig et al., “Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life,” *PLoS One*, vol. 8, no. 6, Article ID e66986, 2013.
- [30] U. Nübel, B. Engelen, A. Felske et al., “Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis,” *Journal of Bacteriology*, vol. 178, no. 19, pp. 5636–5643, 1996.
- [31] H. G. Heilig, E. G. Zoetendal, E. E. Vaughan, P. Marteau, A. D. L. Akkermans, and W. M. De Vos, “Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, no. 1, pp. 114–123, 2002.
- [32] R. Martín, S. Delgado, A. Maldonado et al., “Isolation of lactobacilli from sow milk and evaluation of their probiotic potential,” *Journal of Dairy Research*, vol. 76, no. 4, pp. 418–425, 2009.
- [33] J. H. Lee, R. Diono, G. Y. Kim, and D. B. Min, “Optimization of solid phase microextraction analysis for the headspace volatile compounds of Parmesan cheese,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, no. 5, pp. 1136–1140, 2003.
- [34] E. B. Roessler, R. M. Pangborn, J. L. Sidel, and H. Stone, “Expanded statistical tables for estimating significance in paired-preference, paired-difference, duo-trio and triangle tests,” *Journal of Food Science*, vol. 43, no. 3, pp. 940–943, 1978.
- [35] A. Gomes da Cruz, F. C. A. Buriti, C. H. Batista de Souza, J. A. Fonseca Faria, and S. M. Isay Saad, “Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects,” *Trends in Food Science and Technology*, vol. 20, no. 8, pp. 344–354, 2009.
- [36] L. Ong, A. Henriksson, and N. P. Shah, “Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid,” *International Dairy Journal*, vol. 16, no. 5, pp. 446–456, 2006.
- [37] F. C. A. Buriti, J. S. Da Rocha, E. G. Assis, and S. M. I. Saad, “Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*,” *LWT-Food Science and Technology*, vol. 38, no. 2, pp. 173–180, 2005.
- [38] F. C. A. Buriti, J. S. Da Rocha, and S. M. I. Saad, “Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage,” *International Dairy Journal*, vol. 15, no. 12, pp. 1279–1288, 2005.
- [39] A. Talwalkar, C. W. Miller, K. Kailasapathy, and M. H. Nguyen, “Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt,” *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 39, no. 6, pp. 605–611, 2004.
- [40] C. M. Bruhn, J. C. Bruhn, A. Cotter et al., “Consumer attitudes toward use of probiotic cultures,” *Journal of Food Science*, vol. 67, no. 5, pp. 1969–1972, 2002.
- [41] P. L. H. McSweeney, “Biochemistry of cheese ripening,” *International Journal of Dairy Technology*, vol. 57, no. 2-3, pp. 127–144, 2004.
- [42] C. D. Everard, D. J. O’Callaghan, M. J. Mateo, C. P. O’Donnell, M. Castillo, and F. A. Payne, “Effects of cutting intensity and stirring speed on syneresis and curd losses during cheese manufacture,” *Journal of Dairy Science*, vol. 91, no. 7, pp. 2575–2582, 2008.
- [43] D. B. Perry, D. J. McMahon, and C. J. Oberg, “Effect of exopolysaccharide-producing cultures on moisture retention in low-fat Mozzarella cheese,” *Journal of Dairy Science*, vol. 80, no. 5, pp. 799–805, 1997.
- [44] D. Low, J. A. Ahlgren, D. Horne, D. J. McMahon, C. J. Oberg, and J. R. Broadbent, “Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention?” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64, no. 6, pp. 2147–2151, 1998.
- [45] W. Wang, L. Zhang, and Y. Li, “Effect of specialized combined strains on reconstituted milk reduced-fat cheese,” *African Journal of Biotechnology*, vol. 11, no. 5, pp. 1169–1176, 2012.
- [46] E. J. Raftis, E. Salvetti, S. Torriani, G. E. Felis, and P. W. O’Toole, “Genomic diversity of *Lactobacillus salivarius*,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 77, no. 3, pp. 954–965, 2011.
- [47] D. K. Hickey, T. P. Guinee, J. Hou, and M. G. Wilkinson, “Effects of variation in cheese composition and maturation on water activity in Cheddar cheese during ripening,” *International Dairy Journal*, vol. 30, no. 1, pp. 53–68, 2013.
- [48] R. Saurel, A. Pajonk, and J. Andrieu, “Modelling of french emmental cheese water activity during salting and ripening periods,” *Journal of Food Engineering*, vol. 63, no. 2, pp. 163–170, 2004.
- [49] C. H. B. De Souza, F. C. A. Buriti, J. H. Behrens, and S. M. I. Saad, “Sensory evaluation of probiotic Minas fresh cheese with *Lactobacillus acidophilus* added solely or in co-culture with a thermophilic starter culture,” *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 43, no. 5, pp. 871–877, 2008.

- [50] N. H. Ahmed, M. El Soda, A. N. Hassan, and J. Frank, "Improving the textural properties of an acid-coagulated (Kari-sh) cheese using exopolysaccharide producing cultures," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 38, no. 8, pp. 843–847, 2005.
- [51] M. B. Frøst and T. Janhøj, "Understanding creaminess," *International Dairy Journal*, vol. 17, no. 11, pp. 1298–1311, 2007.
- [52] G. Smit, B. A. Smit, and W. J. M. Engels, "Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products," *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 29, no. 3, pp. 591–610, 2005.
- [53] C. H. B. Souza and S. M. I. Saad, "Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physico-chemical and related properties of Minas fresh cheese during storage," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 42, no. 2, pp. 633–640, 2009.

VIII. POTENCIAL DE *Enterococcus faecium* LJx4, UNA CEPA AISLADA DE LECHE HUMANA, PARA LA INDUSTRIA LÁCTEA

Manuscrito en preparación

VIII.1. Abstract

In this work, a variety of biochemical properties of *Enterococcus faecium* LJx4, which had been isolated from breast milk, were analyzed. Its acidifying capacity and proteolytic activity were low but, in contrast, remarkable peptidase and esterase activities were observed. Ethanol and 3-hydroxy-2-butanone were the most abundant volatile compounds found in experimental model cheese manufactured with *E. faecium* LJx4. This strain inhibited the growth of several *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains *in vitro*. Model fermented milk and cheeses were manufactured from milk inoculated or not with *L. innocua* SA1 (2.5-3 log₁₀ colony forming units mL⁻¹) using *E. faecium* LJx4 or *Lactococcus lactis* ESI 153 as starter cultures. Although *E. faecium* LJx4 controlled *Listeria* growth in both dairy models, it led to lower reduction in *Listeria* counts when it was compared with *L. lactis* ESI 153. In conclusion, our results indicate that *E. faecium* LJx4 could be useful as adjunct and/or bioprotective culture in dairy products.

Keywords: *Enterococcus faecium*, human milk, technological properties, dairy models, *Listeria*

VIII.2. Introduction

Enterococci are widely distributed in nature, since they are frequently found in the environment, associated with food or as components of the human and animal intestinal microbiota (Lebreton et al., 2014). Their facility to colonize such diverse ecological niches is related to their ability to grow on different substrates and resistance to adverse environmental conditions (Giraffa, 2002). At present, *Enterococcus* is the most controversial genus among the lactic acid bacteria (LAB). On one hand, some hospital-associated strains may harbour recognized virulence determinants and have been involved in nosocomial infections, especially in immunocompromised patients (Foulquié Moreno et al., 2006; Van Tyne and Gilmore, 2014). Enterococci are intrinsically resistant to many different classes of antibiotics regularly used to treat human clinical infections, and have the potential to acquire and/or transfer antibiotic resistance genes, including some used as a last resort treatment for multiple antibiotic resistant bacteria (Mundy et al., 2000; Pesavento et al., 2014). On the other hand, enterococci play a vital role in the manufacture of diverse fermented products, such as many cheeses, dry fermented sausages, cured meat products or olives, while some enterococcal strains are used as probiotics (Franz et al., 2003; Franz et al., 2011).

Enterococcus faecalis, *E. faecium* and *E. durans* are the most frequently isolated species from dairy products, specially from Mediterranean-type cheeses regardless they are manufactured from raw or pasteurized cows', goats' or ewes' milk (Foulquié Moreno et al., 2006; Nieto-Arribas et al., 2011). Relatively high numbers of enterococci can be found immediately post manufacture (4 to 6 log₁₀ CFU g⁻¹ in the curd) and they remain at that level (5 to 7 log₁₀ CFU g⁻¹) until the end of ripening of these cheeses (Ogier and Serror, 2008). They contribute to ripening and flavour development in cheese due to proteolytic and esterolytic activities and citrate metabolism (Centeno et al., 1999; Sarantinopoulos et al., 2001). In addition, many enterococcal strains produce antimicrobial compounds including a large number of different bacteriocins which can inhibit the growth of many food-borne pathogens (Franz et al., 2007). Among them, *Listeria monocytogenes* accounts for more than half of the alert notifications of pathogenic microorganisms in cheese and milk in 2014, according to the Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) portal created by European food safety authorities (RASFF, 2014). *L. monocytogenes* is frequently found in the environment of the dairy industry because of its ability to adapt and proliferate at low temperature, low pH and high salt content and to form biofilms allowing the contamination of final products (Bonsaglia et al., 2014). Listeriosis is an uncommon (0.31 per 100.000 in European countries in 2011; ECDC, 2013) but severe disease for susceptible groups such as elderly, pregnant women and immune compromised individuals. Therefore, this microorganism represents a relevant concern to food industries.

The characterization of human milk microbiota in healthy women has revealed that it includes a relatively narrow spectrum of Gram-positive bacteria and, among them, enterococcal strains are frequently found in this biological fluid (Heikkilä and Saris, 2003; Martín et al., 2003; Jiménez et al., 2013). These commensal bacteria are able to colonize and seem to play an active role on several host functions, including the protection against infections or the maturation of the immune system (Fernández et al., 2013).

In a previous work, seven *E. faecium* strains isolated from breast milk of healthy women were screened for the presence of several genetic and phenotypic traits of clinical relevance. None of the strains showed any potential virulence determinant, suggesting that they are safe and can behave as commensal or mutualistic bacteria (Reviriego et al., 2005). The aim of the present study was to analyze some traits of technological relevance for one of those strains, *E. faecium* LJx4, in order to evaluate their potential application as starter or adjunct culture in fermented dairy products.

VIII.3. Materials and methods

VIII.3.1. Bacterial strains and culture conditions

E. faecium LJx4 was previously isolated from human milk (Reviriego et al., 2005). LAB strains of dairy origin used in this study as controls were obtained from the culture collection maintained in our laboratory. Strains *E. faecalis* TAB 28 and TAB 52 were originally isolated from raw milk (Rodríguez et al., 2000). *E. durans* AZ6, that was isolated from raw goats' milk cheese, was included for its remarkable esterase activity. Several *Lactococcus lactis* strains, that are the most commonly found in dairy environments and widely used as dairy starters, were also included for comparison purposes. *L. lactis* subsp. *lactis* ESI 153 and ESI 515 were isolated from artisan raw milk cheeses and have been used as adjuncts and/or starter cultures in cheese manufacture (Cogan et al., 1997, Rodríguez et al., 1998). *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* use citrate to produce desirable aroma compounds and it is often included in cheese starter cultures; strain 18-16 was originally isolated at the Department of Microbiology, Oregon State University. The major esterase of *L. lactis* subsp. *cremoris* E8 has been extensively characterized (Holland and Coolbear, 1996). *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 is a commercial strain that is widely used to potentiate flavour development in cheese (Bartels et al., 1987).

The following *Listeria* strains were used as indicators to study the anti-*Listeria* activity: *L. monocytogenes* ScottA, Ohio, CA and SLR1 and *L. innocua* RdC, TFD1 and SA1. Stock cultures of enterococci and lactobacilli were kept in MRS (Oxoid, Basingstoke, UK), lactococci in M17 (Oxoid) supplemented with 0.5% (w/v) glucose (GM17), and *Listeria* strains in brain heart infusion (BHI; Oxoid) broth plus glycerol

(15% v/v) at -80 °C. Stock cultures were subcultured (1%, v/v) in the corresponding media before use, and incubated at 30 °C, except *Lb. helveticus* CNRZ32 which was incubated at 37 °C, and *Listeria* at 32 °C.

VIII.3.2. Acidifying activity

The acidifying activity of *E. faecium* LJx4 and other reference bacterial strains was evaluated by measuring the pH variation and the titratable acidity in heat treated (121 °C, 5 min) reconstituted 10% (w/v) skim milk powder (HT-RSM) (Oxoid). After subculturing in MRS broth and, then, in HT-RSM at 30 °C, the microbial culture was used to inoculate (1%, v/v) HT-RSM. The pH and acidifying activity were measured after incubation for 6, 12, and 24 h at 30 °C. The titratable acidity was determined by titration with 0.11 M NaOH in the presence of phenolphthalein, and it was expressed as the amount of lactic acid produced (g 100 mL⁻¹). Both parameters, pH and acidity, were estimated using two replicates in duplicate experiments for each bacterial strain.

VIII.3.3. Proteolytic activity

Proteolytic activity was determined with the OPA (*o*-phthaldialdehyde) spectrophotometric assay test as described by Church et al. (1983). This assay detects α -amino groups released by hydrolysis of protein after the reaction with OPA and β -mercaptoethanol to form a complex that absorbs strongly at an optical density of 340 nm (OD₃₄₀). Bacteria were subcultured in MRS broth at 30 °C, then washed and resuspended to the original volume with 0.32 mM sodium phosphate, pH 7.2. Washed cells were used to inoculate (1%, v/v) HT-RSM. Proteolytic activity was assessed after 24 h of incubation at 30 °C. Proteolytic activity values were expressed as the increase in OD₃₄₀ over an uninoculated milk sample that served as control.

VIII.3.4. Aminopeptidase, esterase, and lipase activities

Bacterial strains were grown overnight in MRS broth at 30 °C (except for *Lb. helveticus* CNRZ32 that was grown at 37 °C) to obtain cell-free extracts (CFE) and assay aminopeptidase and esterase activities in CFEs as described by Cárdenas et al. (2014b). Aminopeptidase activities in CFEs were tested using L-alanine *p*-nitroanilide (Ala-*p*NA), L-leucine *p*-nitroanilide (Leu-*p*NA), L-lysine *p*-nitroanilide (Lys-*p*NA), L-proline *p*-nitroanilide (Pro-*p*NA), L-glutamic acid *p*-nitroanilide (Glu-*p*NA), and glycyl-proline *p*-nitroanilide (Gly-Pro-*p*NA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The specific peptidase activity was expressed as nmol of *p*-nitroaniline released per mg of protein in CFE and hour. Lipolytic activities of the strains were determined using α -naphthyl (α NA) derivatives of fatty acids as substrates: acetic (C2), propionic (C3), butyric (C4), and caproic (C6) acids for esterase, and palmitic (C16) and stearic (C18) derivatives for lipase (Sigma). The specific esterase and lipase activities were expressed as μ mol of α -naphthol released per mg of protein in CFE and hour. All enzymatic activities were measured in triplicate in two independent experiments.

VIII.3.5. *Post-electrophoretic detection of intracellular esterases*

CFEs (~ 150 mg of protein) were subjected to ultra low gelling agarose (ULGA)-PAGE using non denaturing conditions and 50 mM HEPES buffer pH 7.2 plus 5 mM MgCl₂ following the method described by Benoist and Schwencke (1990) in a Mini Protean 2 electrophoresis cell (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). The ULGA-PAGE was conducted at 60 V for 2 h. After migration, the gel was equilibrated for 20 min in 100 mM HEPES buffer pH 7.5 containing 100 mM NaCl and 5 mM MgCl₂. The staining procedure was performed incubating the gel with gentle agitation in the same buffer containing 20 mM C2-, C3-, or C4- α NA (dissolved in dimethyl sulfoxide) as substrate, and 1% w/v Fast Garnet GBC salt (Sigma). Esterase active bands were visualized as deep purple or black bands in the gel.

VIII.3.6. *Experimental model cheese manufacture*

Manufacture of model cheeses was carried essentially as described by Rodríguez et al. (2005) and the modifications reported by Cárdenas et al. (2014a). Cheeses were made from commercial pasteurized (HTST) cow's milk in trials carried out on consecutive weeks.

VIII.3.7. *Analysis of volatile compounds*

To determine the impact of *E. faecium* LJx4 in volatile compounds in experimental cheeses, four cheese vats were manufactured with 1% of a HT-RSM (~9 log₁₀ CFU mL⁻¹) culture of either *E. faecium* LJx4 or *L. lactis* ESI 153 as starter culture (two vats for each strain). Cheeses were analyzed to characterize their volatile compound profile after 28 days at 4 °C. The volatile compounds were extracted by solid-phase microextraction (SPME) and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) according to the procedure and using the equipment described by Cárdenas et al. (2014a). Cheese samples were tested in duplicate.

VIII.3.8. *Anti-Listeria activity of E. faecium LJx4 in vitro*

The anti-*Listeria* activity of *E. faecium* LJx4 was evaluated using an overlay method (Magnusson and Schnürer, 2001). *E. faecium* LJx4 was grown on MRS agar plates (~ 2-cm-long lines) at 30 °C for 24 h and, then, overlaid with 10 mL of soft BHI agar (0.7% w/v; Oxoid) containing the indicator *Listeria* strain at a concentration of ~ 5 log₁₀ CFU. After incubation at 32 °C for 48 h, the plates were examined for clear zones of inhibition (> 2 mm) around the *E. faecium* streaks. The experiments to assay the inhibitory activity were performed in triplicate.

Subsequently, the production of bacteriocin-like inhibitory substances was investigated by an agar well diffusion assay. For this purpose, *E. faecium* LJx4 was grown in MRS broth at 30 °C until early stationary phase (OD₆₂₀ ~1.0). The culture

was centrifuged at $12,000 \times g$ for 10 min at 4 °C, and the supernatant was neutralized to 6.2 with 1 M NaOH, heated at 100 °C for 5 min and filter-sterilized through 0.22 μm -pore-size filters (Millipore, Bedford, MA, USA). Aliquots (50 μl) of the supernatant were placed in wells (7-mm diameter) cut in cooled BHI agar plates previously seeded ($5 \log_{10} \text{CFU mL}^{-1}$) with the above mentioned indicator strains. The plates were kept at 4 °C for 2 h and, then, incubated at 30 °C for 24 h. The analyses were performed in triplicate.

VIII.3.9. Inhibition of *L. innocua* SA1 by *E. faecium* LJx4 in model fermented milk

E. faecium LJx4 was assayed for inhibition of *Listeria* during growth in 10% (w/v) HT-RSM. *L. lactis* ESI 153, a non-bacteriocin producer, was employed as control. *L. innocua* SA1 was selected as indicator to evaluate the anti-*Listeria* activity of *E. faecium* LJx4 since it is non-pathogenic and preliminary assays revealed that its sensitivity is very similar to that of some pathogenic *L. monocytogenes* strains, such as Scott A (data not shown). Each of three batches (200 mL) of HT-RSM was inoculated with either *E. faecium* LJx4 ($\sim 8 \log_{10} \text{CFU mL}^{-1}$), *L. lactis* ESI 153 ($\sim 8 \log_{10} \text{CFU mL}^{-1}$) or *L. innocua* SA1 ($\sim 2.5 \log_{10} \text{CFU mL}^{-1}$). Parallel, other two batches were co-inoculated with the indicated concentrations of *L. innocua* SA1 and either *E. faecium* LJx4 or *L. lactis* ESI 153. Each batch was distributed in tubes (20 mL) that were maintained at 30°C for 16 h. The pH and bacterial counts were determined at 0, 4, 8, 12 and 16 h. Enterococcal counts were determined on Kanamycin Aesculin Azide (KAA; Oxoid) agar plates incubated at 37 °C for 24 h, lactococcal counts on GM17 agar plates incubated at 32 °C for 24 h, and *Listeria* counts on PALCAM agar plates (bioMérieux, Marcy L'Etoile, Francia) incubated at 32 °C for 48 h. The assay was performed in duplicate.

VIII.3.10. Inhibition of *L. innocua* SA1 by *E. faecium* LJx4 in model cheese

To test the anti-*Listeria* activity of *E. faecium* LJx4 in cheese, ten vats of model cheese were manufactured in each trial following the procedure described by Cárdenas et al. (2014a). Four vats were inoculated with 1% of a HT-RSM culture of *E. faecium* LJx4; two of them were co-inoculated with *L. innocua* SA1 to reach a final concentration of about $3 \log_{10} \text{CFU mL}^{-1}$ while the remaining two served as controls. Similarly, other four vats were inoculated with 1% of a HT-RSM culture of *L. lactis* ESI 153; two of them were co-inoculated with *L. innocua* SA1 ($\sim 3 \log_{10} \text{CFU mL}^{-1}$), and two served as controls. Finally, the remaining two vats were inoculated only with *L. innocua* SA1 ($\sim 3 \log_{10} \text{CFU mL}^{-1}$). After salting, the resulting cheeses were cut into 5 pieces, which were individually vacuum packed in Cryovac plastic bags and kept at 12 °C for 4 weeks.

Cheeses were sampled at days 1 (prior vacuum packaging), 7, 14, 21, and 28. Cheese pH was measured in duplicate on the indicated sampling days with a Crison pH-meter (GPL 22, Crison Instruments, Alella, Spain) provided of a Crison electrode (model 52-3,2, Crison Instruments). Enterococcal, lactococcal and *Listeria* counts were determined as described above using appropriate dilutions of cheese samples homogenized in sterile 2% (w/v) sodium citrate peptone in lab blender (Masticator, IUL Instruments, Barcelona, Spain) for 2 min.

VIII.3.11. Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) was applied to determine differences among the mean values obtained for the strains, and it was followed by Tukey post hoc test. Differences were considered significant at $p < 0.05$. Statgraphics Centurion XVI version 16.2.04 (Statpoint Technologies Inc., Virginia, USA) was used to carry out the analyses cited above.

VIII.4. Results

VIII.4.1. Acidifying activity: titratable acidity and pH

The acidifying activity of *E. faecium* LJx4 was evaluated by the decrease of pH and the lactic acid produced during its growth in HT-RSM and compared to that of other dairy enterococci and lactococci strains (Table 1). After 6 h at 30 °C, *E. faecium* LJx4 decreased milk pH from 6.57 to 6.09 and the equivalent amount of lactic acid produced was 0.08 ± 0.02 g per 100 mL (Table 1). The acidifying activity of other enterococci isolated from raw milk (*E. faecalis* TAB28 and TAB52) and from artisan cheese (*E. durans* AZ6) included in this study did not differ significantly ($p < 0.05$) from that registered for *E. faecium* LJx4. The highest acidifying activity at any time point was displayed by the strains *L. lactis* E8 and ESI 153 (Table 1).

E. faecium LJx4 did not led to milk coagulation and the decrease of the milk pH value was 5.63 and the lactic acid production was 0.18 g of lactic acid per 100 mL after 24 h at 30 °C, similarly to *E. faecalis* TAB 52 and in contrast to other enterococci and lactococci analyzed in this work (Table 1).

VIII.4.2. Proteolytic and aminopeptidase activities

The proteolytic activity of *E. faecium* LJx4, determined as the free α -amino groups resulting from the proteolysis of milk proteins and measured as the ΔOD_{340} , was 0.007 ± 0.001 (Table 2). The highest proteolytic activity corresponded to *E. faecalis* TAB 28 ($OD_{340} = 0.286 \pm 0.011$), followed by *L. lactis* E8 and *L. lactis* ESI 153 ($OD_{340} = 0.206 \pm 0.003$ and 0.141 ± 0.007 , respectively). None of the other enterococcal and lactococcal strains listed in Table 2 displayed proteolytic activity.

Actually, the amount of α -amino groups accumulated in their milk cultures was below that of the inoculated control milk, suggesting that these low molecular weight compounds were taken up by the growing bacteria as a nitrogen source.

The peptidase activities of *E. faecium* LJx4 and some reference lactic acid bacteria isolated from dairy products are presented in Table 3. The aminopeptidase profile of *E. faecium* LJx4 was similar to that of *E. faecalis* TAB 28 and TAB 52 because they hydrolyzed Ala-, Leu- and Lys-*p*NA, and did not degrade Pro-*p*NA. Although both *E. faecalis* strains did not display activity on Glu-*p*NA, *E. faecium* LJx4 efficiently hydrolyzed this substrate. Among all enterococci tested, *E. durans* AZ6 displayed broader substrate specificity against synthetic substrates (including Pro- and Glu-*p*NA) and the highest peptidase activities. None of the *Enterococcus* strains hydrolyzed Gly-Pro-*p*NA (Table 3).

All *L. lactis* strains tested (ESI 153, ESI 515, 18-16, and E8) hydrolyzed the six synthetic amino acid derivatives assayed (Table 3). Although some variability was observed among the lactococci, globally their aminopeptidase activities were higher than those displayed by the enterococci. However, the highest aminopeptidase activities were linked to *Lb. helveticus* CNRZ32 for all the amino acid derivatives, except for Glu-*p*NA (Table 3).

VIII.4.3. Esterase and lipase activities

The highest esterase activities of *E. faecium* LJx4 were registered on α NA derivatives of propionic and butyric acids (86.71 ± 4.04 and 64.88 ± 3.94 $\mu\text{mol } \alpha\text{-naphthol mg}^{-1} \text{ protein h}^{-1}$, respectively) while the activity was lower on acetic- and caproic acid derivatives (17.52 ± 1.00 and 17.14 ± 1.90 $\mu\text{mol } \alpha\text{-naphthol mg}^{-1} \text{ protein h}^{-1}$, respectively) (Fig. 1). The pattern of esterase activities displayed by *E. faecium* LJx4 was similar to that of other enterococci. In contrast, low intracellular esterase activities for the four assayed substrates were noted for lactococci strains and *Lb. helveticus* CNRZ32, although inter-strain differences were observed (Fig. 1). None of the strains showed lipolytic activity on α NA derivatives of palmitic and stearic acids (data not shown).

Detection of esterase activity after electrophoretic separation of proteins present in bacterial CFEs revealed that esterase profiles of LAB were rather complex, and exhibited great diversity even at the species level (Fig. 2). *E. faecium* LJx4 possessed only one major band ($R_f = 0.34$) with esterase activity on C4- α NA. Similar results were obtained when C2- and C3- α NA were used as substrates (data not shown). The esterase profile of *E. faecalis* TAB 28 and TAB 52 and *E. durans* AZ6 displayed one additional band ($R_f = 0.27$), also active on C2- and C3- α NA. Other LAB strains showed between 1 and 3 bands with esterase activity were detected in, but the profiles were strain-specific (Fig. 2).

VIII.4.4. Volatile analysis

A total of 41 volatile compounds were identified in the experimental cheeses manufactured with *E. faecium* LJx4 by SPME-GC-MS and are shown in Table 4. The volatile compounds were classified in groups: 3 aldehydes, 8 ketones, 6 alcohols, 2 esters, 4 alkanes, 6 aromatic compounds, 9 carboxylic and fatty acids, and 2 terpenes. The volatile compounds isolated from cheeses manufactured with *L. lactis* ESI 153 were identical, but there were important differences in the levels of the compounds when compared with those elaborated with *E. faecium* LJx4. Ethanol, 3-hydroxy-2-butanone (acetoin), hexanoic acid, and 2-propanone were the most abundant volatile compounds found in cheese manufactured with *E. faecium* LJx4, while 3-methyl-1-butanol, acetic, butanoic, hexanoic, and octanoic acids were the predominant ones identified in cheese manufactured with *L. lactis* ESI 153 (Table 4).

VIII.4.5. Anti-Listeria activity in vitro

E. faecium LJx4 showed antimicrobial activity (clearing zone of inhibition bigger than 2 mm around the *E. faecium* LJx4 streak) against *L. monocytogenes* ScottA, Ohio, CA and SLR1 and *L. innocua* RdC, TFD1 and SA1 when evaluated with an overlay method (data not shown). However, production of bacteriocin-like inhibitory substances was not detected by an agar well diffusion test in the assayed conditions (data not shown).

VIII.4.6. Control of *L. innocua* SA1 in model fermented milk

The effect of *E. faecium* LJx4 against *L. innocua* SA1 was evaluated in a fermented milk model. The growth of *E. faecium* LJx4 was not modified significantly ($p < 0.05$) by the presence of *L. innocua* SA1 in milk (Fig 3A). The initial concentration of *E. faecium* LJx4 was $8.06 \log_{10}$ CFU mL⁻¹ and increased by $0.51 \log_{10}$ units after 16 h at 30°C; concomitantly, the milk pH descended from 6.67 to 5.44 (Figure 3B). When the model fermented milk was co-inoculated with *E. faecium* LJx4 and *L. innocua* SA1 ($2.63 \log_{10}$ CFU mL⁻¹), the final counts of *Listeria* were $3.34 \log_{10}$ CFU mL⁻¹, 4.41 log units lower than in the control milk containing only *L. innocua* SA1 (Figure 3C). In comparison, *L. lactis* ESI 153 reached $9.32 \log_{10}$ CFU mL⁻¹ and the final pH of the fermented milk was 4.13 under the same conditions (Figures 3A and B); when *L. lactis* ESI 153 was co-inoculated with *L. innocua* SA1, the final *Listeria* count was $2.41 \log_{10}$ CFU mL⁻¹.

VIII.4.7. Control of *Listeria* in a cheese model

The anti-*Listeria* activity of *E. faecium* LJx4 was also tested in an experimental cheese model with *L. innocua* SA1. In cheeses manufactured with *E. faecium* LJx4, enterococcal counts did not change significantly during the storage period (from $8.15 \log_{10}$ CFU mL⁻¹ at day 1 to $8.08 \log_{10}$ CFU mL⁻¹ at day 28; $p = 0.846$, one-way

ANOVA) (Figure 4A) and the pH decreased from 6.44 (day 1) to 6.30 (day 28) ($p = 0.115$, one-way ANOVA). When the milk used for cheese manufacture was inoculated with *L. innocua* SA1, *Listeria* viable counts in cheese were $4.64 \log_{10}$ CFU g⁻¹ at day 1 and increased slightly to $5.04 \log_{10}$ CFU g⁻¹ at day 28, although the change was not statistically significant ($p = 0.730$, one-way ANOVA) (Fig. 4C). In contrast, in a cheese model manufactured without enterococci or lactococci and inoculated with *L. innocua* SA1, the listerial counts increased from $2.92 \log_{10}$ CFU mL⁻¹ in milk to $7.27 \log_{10}$ CFU g⁻¹ in cheese at day 1, and reached $8.05 \log_{10}$ CFU mL⁻¹ at day 28. In comparison, higher lactococcal counts ($9.58 \log_{10}$ CFU mL⁻¹ at day 1 and $8.34 \log_{10}$ CFU mL⁻¹ at day 28) and lower pH values (4.84 at day 1 and 5.06 at day 28) were found in cheeses manufactured with *L. lactis* ESI 153; *Listeria* counts did not increase during storage ($3.46 \log_{10}$ CFU g⁻¹ at day 1 and $2.93 \log_{10}$ CFU g⁻¹ at day 28).

VIII.5. Discussion

Fermented dairy products are generally perceived as natural, safe, healthy, nutritious, and organoleptically attractive, and their desirable characteristics are mostly due to the growth and metabolism of selected microorganisms (Cogan et al., 2007). Industrial practice nowadays aims to tightly control the fermentation process and to get uniform and consistent fermented products that are frequently described as having bland uniform organoleptic properties and lack attractiveness. In this context it would be desirable to find new strains to increase the biodiversity, as well as to diversify and develop desired and/or distinct characteristics in fermented foods (Cogan et al., 2007; Peláez and Requena, 2005).

In a previous study, microbiological characterization of breast milk from 10 healthy mothers revealed that *E. faecium* was one of the predominant species, and it was present in milk samples from 9 women at a relatively high level ($> 3 \log_{10}$ CFU mL⁻¹) (Martin et al., 2003). Further characterization of 7 *E. faecium* strains isolated during that study demonstrated that they lacked genetic and phenotypic traits of clinical relevance (Reviriego et al., 2005). An increasing number of enterococcal strains are considered to display desirable technological properties, including bacteriocin production and probiotic properties (Foulquié Moreno et al., 2006; Franz et al., 2011). Thereby, technologically relevant properties of *E. faecium* LJx4, a strain isolated from human milk, were evaluated to determine its usefulness for the manufacture of fermented dairy products.

Acid production is one of the most relevant properties of starter cultures leading to good milk coagulation and avoiding the growth of undesirable microorganisms. A good acid-producing starter culture will reduce the pH of milk to 5.3 in 6 h (Cogan et al., 1997). Therefore, *E. faecium* LJx4 can be considered as poor milk acidifier, but neither were other food-related enterococci and most lactococci strains assayed in this

work. This behaviour is usually found in LAB not related to dairy commercial starter cultures, as it is the case of the vast majority of *Lactococcus* and *Enterococcus* isolates from artisan cheeses (Alonso-Calleja et al., 2002; Ayad et al., 2000; Sarantinopoulos et al., 2001).

Proteolytic activity is highly desirable for rapid bacterial growth in milk and contributes to cheese texture and flavour (Sousa et al., 2001). However, *E. faecium* LJx4 did not exhibit relevant proteolytic activity, in agreement with many studies that have shown that despite a high inter-strain variability, the proteolytic activity of enterococci in milk is generally scarce (Andrighetto et al., 2001; Psoni et al., 2006).

The slow acidification and low proteolytic activity of *E. faecium* LJx4 suggest that it would not be suitable as industrial starter organism. However, there is an increasing interest on the search for and selection of strains contributing to enhance cheese flavour, which is linked to enzymatic breakdown of milk protein and fat. Precisely, enterococci play a key role in the maturation and flavour development in many cheeses from Southern Europe (Franz et al., 2003; Foulquié Moreno et al., 2006). *E. faecium* LJx4 exhibited peptidase activity on Ala-, Leu-, Lys-, and Glu-*p*NA, revealing the presence of at least one aminopeptidase. However, its peptidase activity was low compared with other LAB analyzed in this work, in agreement with previous reports on peptidase activity of enterococci isolated from dairy products (Arizcun et al., 1997; Psoni et al., 2006; Tsakalidou et al., 1994). *Lb. helveticus* CNRZ32 is used commercially as an adjunct culture to reduce bitterness in cheese and its proteolytic system has been characterized in detail (Christensen et al., 1999). Its aminopeptidase activity was remarkable high on all assayed substrates, except Glu-*p*NA. Interestingly, the highest aminopeptidase activity of *E. faecium* LJx4 was shown precisely on this amino acid derivative. LAB metabolize glutamic acid through several routes increasing the production of potent flavour compounds, such as isovaleric acid, that contribute to cheese flavour (Kieronczyk et al., 2003; Sousa et al., 2001; Urbach, 1997). It is noteworthy that enterococci did not hydrolyze Pro-*p*NA or Glu-Pro-*p*NA, with the exception of *E. durans* AZ6. General aminopeptidases from LAB are not active on proline peptide bonds, which require proline-specific peptidases. Proline-containing peptides are bitter and their hydrolysis substantially improves cheese flavour (Park et al., 1995).

Lipolysis is another important biochemical phenomenon during cheese ripening, as the short-chain fatty acids released directly affect cheese flavour and are the source of much more potent flavour compounds (methyl ketones, lactones, esters, secondary alcohols, and aldehydes) (Molimard and Spinnler, 1996). LAB esterases also catalyze ester synthesis in aqueous systems, although it is unknown if they have the same activity in cheese (Fenster et al., 2003; Holland et al., 2005). Butyric and propionic acid were the preferred substrates for enterococcal esterases which activity was higher than that of lactococci strains or *Lb. helveticus* CNRZ32, as it has been shown in other

studies (Abeijón et al., 2006; Katz et al., 2007; Oliszewski et al., 2007; Tsakalidou et al., 1994). Complex esterase electrophoretic patterns were revealed in CFE of enterococci other than *E. faecium* LJx4, lactococci, and *Lb. helveticus* CNRZ32. Electrophoretic polymorphism of esterases is frequently found in bacteria where it has been used as taxonomical tool or marker for epidemiological studies (Goullet and Picard, 1995; Ouzari et al., 2006).

Alcohols, ketones and carboxylic and fatty acids were the most abundant volatile compounds found in the experimental cheeses manufactured in this study. Unfortunately, their exact impact on the flavour perception of the product can not be assessed at the moment because it depends not only on the concentration and threshold concentration of the flavour compounds but, also, on possible interactions between taste, aroma and structure components in the cheese (Smit et al., 2005). The screening of bacterial strains from natural niches, and their combination with industrial strains if required, has been claimed as an interesting possibility for the development of custom-made starter cultures because they have been found to produce unusual flavour components and/or profiles (Ayad et al., 1999; Smit et al., 2005). In this sense, cheese manufactured with *E. faecium* LJx4 did not have a high concentration of the primary alcohol 3-methyl-1-butanol, which is present in relatively large quantities in cheeses giving alcoholic and floral notes, in contrast with that elaborated with *L. lactis* ESI 153; on the other hand, *E. faecium* LJx4 increased five-fold the concentration of acetoin and ten-fold that of ethanol, a fact that could lead to cheese with buttery, alcoholic and floral notes (Molimard and Spinnler, 1996).

A relevant feature for bacterial cultures used in food fermentation is their contribution to the microbiological safety of the fermented product, due to microbial competitive exclusion and/or production of antimicrobial compounds (biopreservation) (Stiles, 1996). Several *E. faecium* strains isolated from food had been shown to produce bacteriocins that inhibit the growth of food-borne pathogens, including *Listeria* spp. (Nes et al., 2014; Favaro et al., 2014). *E. faecium* LJx4 had anti-*Listeria* activity *in vitro*, albeit the production of bacteriocin-like inhibitory substances could not be confirmed in the assayed conditions. However, it produced ten-fold more ethanol than *L. lactis* ESI 153, and it has been long shown that ethanol enhanced the killing of *L. monocytogenes* by exposure to different environmental stresses (Barker and Park, 2001). *L. innocua* SA1 was inoculated in pasteurized milk to be used for the manufacture of fermented milk and cheese models in order to simulate a post pasteurization contamination; the level of inoculation was chosen to monitor *Listeria* survival without the use of recovery methods. The population of *L. innocua* was controlled by *E. faecium* LJx4 in both types of products, although not as efficiently as *L. lactis* ESI 153, a strain that attained a higher population level (about 1 log₁₀ unit), lower pH values in the product and a higher amount of acetic acid. Globally, the results obtained in this work suggest a bacteriostatic action of *E. faecium* LJx4 against *L. innocua* SA1, which may be effective for *Listeria* control when combined with other

environmental barriers or bacteria and considering the high survival rate of the enterococcal strain. In fact, complex microbial consortiums display a higher bacteriostatic effect against *L. monocytogenes* than a starter culture alone in cheese, although the exact mechanism of the antilisterial action and the microbial interactions remain unknown (Callon et al. 2014).

VIII.6. Conclusion

In summary, *E. faecium* LJx4, which had been isolated previously from breast milk and shown to be safe, displays poor acidifying and proteolytic activities. However, its aminopeptidase and esterase activities could impact cheese characteristics. In fact, *E. faecium* LJx4 determined a distinct composition in volatile compounds in experimental cheeses in comparison to *L. lactis* ESI 153. In addition, *E. faecium* LJx4 displayed moderate anti-*Listeria* activity both *in vitro* and *in vivo*. These results suggest that *E. faecium* LJx4 could be useful as adjunct and/or bioprotective culture in the dairy industry, rather than as starter culture.

Acknowledgments

This work was supported by the FUN-C-FOOD (Consolider-Ingenio 2010) and AGL2007-62042 projects from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

VIII.7. References

1. Abeijón, M. C., Medina, R. B., Katz, M. B., González, S. N. 2006. Technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from ewe's milk and cheese with importance for flavour development. Can. J. Microbiol. 52, 237–45. Erratum in: Can. J. Microbiol. 52, 913.
2. Alonso-Calleja, C., Carballo, J., Capita, R., Bernardo, A., García-López, M. L. 2002. Comparison of the acidifying activity of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains isolated from goat's milk and Valdeteja cheese. Lett. Appl. Microbiol. 34, 134–138.
3. Andrighetto, C., Knijff, E., Lombardi, A., Torriani, S., Vancanneyt, M., Kersters, K., Swings, J., Dellaglio, F. 2001. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. J. Dairy Res. 68, 303–316.
4. Arizcun, C., Barcina, Y., Torre, P. 1997. Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from milk and Roncal and Idiazabal cheese. Int. J. Food Microbiol. 38, 17–24.

5. Ayad, E. H. E., Verheul, A., de Jong, C., Wouters, J. T. M., Smit, G. 1999. Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. *Int. Dairy J.* 9, 725–735.
6. Ayad, E. H. E., Verheul, A., Wouters, J. T. M., Smit, G. 2000. Application of wild starter cultures for flavour development in pilot plant cheese making. *Int. Dairy J.* 10, 169–179.
7. Barker, C., Park, S.F. 2001. Sensitization of *Listeria monocytogenes* to low pH, organic acids, and osmotic stress by ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1594–1600.
8. Bartels, H. J., Johnson, M. E., Olson, N. F. 1987. Accelerated ripening of Gouda cheese. I. Effect of heat-shocked thermophilic lactobacilli and streptococci on proteolysis and flavor development. *Milchwissenschaft* 42, 83–88.
9. Benoist, P., Schwencke, J. 1990. Native agarose-polyacrylamide gel electrophoresis allowing the detection of aminopeptidase, dehydrogenase, and esterase activities at the nanogram level: Enzymatic patterns in some *Frankia* strains. *Anal. Biochem.* 187, 337–344.
10. Bonsaglia, E. C. R., Silva, N. C. C., Fernandes Júnior, A., Araújo Júnior, J.P., Tsunemi, M. H., Rall, V. L. M. 2014. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control*, 35, 386–391.
11. Callon, C., Retureau, E., Didienne, R., Montel, M. C. 2014. Microbial biodiversity in cheese consortia and comparative *Listeria* growth on surfaces of uncooked pressed cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 174, 98–109.
12. Cárdenas, N., Calzada, J., Peirotén, A., Jiménez, E., Escudero, R., Rodríguez, J. M., Medina, M., Fernández, L. 2014a. Development of a potential probiotic fresh cheese using two *Lactobacillus salivarius* strains isolated from human milk. *BioMed Res.* 2014, Article ID 801918, 12 pages.
13. Cárdenas, N., Martín, V., Delgado, S., Rodríguez, J. M., Fernández, L. 2014b. Characterisation of *Lactobacillus gastricus* strains isolated from human milk, *Int. Dairy J.* 39, 167–177.
14. Centeno, J. A., Menéndez, S., Hermida, M., Rodríguez-Otero, J. L. 1999. Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* 48, 97–111.
15. Christensen, J. E., Dudley, E. G., Pederson, J. A., Steele, J. L. 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 217–246.
16. Church, H. E., Swaisgood, F. C., Porter, D. H., Catignain, G. L. 1983. Spectrophometric assay using *o*-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J Dairy Sci.* 66, 1219–1227.
17. Cogan, T. M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P. S., Fernandez, I., Gomez, J., Gomenz, R., Kalantzopoulos, G.,

- Ledda, A., Medina, M., Rea, M. C., Rodriguez, E. 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J. Dairy Res.* 64, 409–421.
18. Cogan, T. M., Beresford, T. P., Steele, J., Broadbent, J., Shah, N. P., Ustunol, Z. 2007. Invited Review: Advances in starter cultures and cultured foods. *J. Dairy Sci.* 90, 4005–4021.
19. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2013. Annual Epidemiological Report 2013. Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC; 2013. ISBN 978-92-9193-543-7.
20. Favaro, L., Basaglia, M., Casella, S., Hue, I., Dousset, X., Gombossy de Melo Franco, B. D., Todorov, S. D. 2014. Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from home made white brine cheese. *Food Microbiol.* 38, 228–239.
21. Fenster, K. M., Rankin, S. A., Steele, J. L. 2003. Accumulation of short *n*-chain ethyl esters by esterases of lactic acid bacteria under conditions simulating ripening parmesan cheese. *J. Dairy Sci.* 86, 2818–2825.
22. Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R., Rodríguez, J. M. 2012. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol. Res.* 69, 1–10.
23. Foulquié Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 1–24.
24. Franz, C. M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., Gálvez, A. 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 125–140.
25. Franz, C. M., Stiles, M. E., Schleifer, K. H., Holzapfel, W. H. 2003. Enterococci in foods: a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 105–122.
26. Franz, C. M., van Belkum, M. J., Holzapfel, W. H., Abriouel, H., Gálvez, A. 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 293–310.
27. Giraffa, G. 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26, 163–171.
28. Goulet, P., & Picard, B. 1995. The electrophoretic polymorphism of bacterial esterases. *FEMS Microbiol. Rev.* 16, 7–31.
29. Heikkilä, M. P., Saris, P. E. J. 2003. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J. Appl. Microbiol.* 95, 471–478.
30. Holland, R., Coolbear, T. 1996. Purification of tributyrin esterase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *J. Dairy Res.* 63, 131–140.

31. Holland, R., Liu, S. -Q., Crow, V. L., Delabre, M. -L., Lubbers, M., Bennett, M., Norris, G. 2005. Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavor: milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. *Int. Dairy J.* 15, 711–718.
32. Jiménez, E., Ladero, V., Chico, I., Maldonado-Barragán, A., López, M., Martín, V., Fernández, L., Fernández, M., Álvarez, M. A., Torres, C., Rodríguez, J. M. 2013. Antibiotic resistance, virulence determinants and production of biogenic amines among enterococci from ovine, feline, canine, porcine and human milk. *BMC Microbiol.* 13, 288.
33. Katz, M., Medina, R., González, S., Oliver, G. 2002. Esterolytic and lipolytic activities of lactic acid bacteria isolated from ewe's milk and cheese. *J. Food Prot.* 65, 1997–2001.
34. Kieronczyk, A., Skeie, S., Langsrud, T., Yvon, M. 2003. Cooperation between *Lactococcus lactis* and nonstarter lactobacilli in the formation of cheese aroma from amino acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 734–739.
35. Lebreton, F., Willems, R. J. L., Gilmore, M. S. 2014. *Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut colonization. In: Gilmore, M. S., Clewell, D. B., Ike, Y., et al., editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190427/>.
36. Magnusson, J., Schnürer, J. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1–5.
37. Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M. L., Xaus, J., Fernández, L., Rodríguez, J. M. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J. Pediatr.* 143, 754–758.
38. Molimard, P., Spinnler, H. E. 1996. Review: Compounds involved in the flavour of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. *J. Dairy Sci.* 79, 169–184.
39. Mundy, L. M., Sahm, D. F., Gilmore, M. 2000. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 513–522.
40. Nes, I.F., Diep, D.B., Ike, Y. 2014. Enterococcal bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to niche control. 2014 Feb 16. In: Gilmore, M. S., Clewell, D. B., Ike, Y., et al., editors. *Enterococci: From commensals to leading causes of drug resistant infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190428/>
41. Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J. M., Chicón, R., Cabezas, L., Palop, Ll. 2011. *Enterococcus* populations in artisanal Manchego cheese: Biodiversity, technological and safety aspects. *Food Microbiol.* 28, 891–899.
42. Ogier, J. -C., Serror, P. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 291–301.

43. Oliszewski, R., Medina, R. B., González, S. N., Pérez Chaia, A. B. 2007. Esterase activities of indigenous lactic acid bacteria from Argentinean goats' milk and cheeses. *Food Chem.*, 101, 1446–1450.
44. Ouzari, H., Hassen, A., Najjari, A., Ettoumi, B., Daffonchio, D., Zagorec, M., Boudabous, A., Mora, D. 2006. A novel phenotype based on esterase electrophoretic polymorphism for the differentiation of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *cremoris*. *Let. Appl. Microbiol.* 43, 351–359.
45. Park, S. K., Gibbs, B. F., Lee, B. H. 1995. Effects of crude enzyme of *Lactobacillus casei* LLG on water-soluble peptides of enzyme-modified cheese. *Food Res. Int.* 28, 43–49.
46. Peláez, C., Requena, T. 2005. Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. *Int. Dairy J.* 15, 831–844.
47. Pesavento G, Calónico C, Ducci B, Magnanini A, Lo Nostro A. 2014. Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat. *Food Microbiol.* 41, 1–7.
48. Psoni, L., Kotzamanides, C., Andrighetto, C., Lombardi, A., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki, E. 2006. Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Enterococcus* isolates from Batzos, a raw goat milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 109, 109–120.
49. RASFF, 2014: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/>; Last accessed:
50. Reviriego, C., Eaton, T., Martín, R., Jiménez, E., Fernández, L., Gasson, M. J., Rodríguez, J. M. 2005. Screening of virulence determinants in *Enterococcus faecium* isolated from breast milk. *J. Human Lact.* 21, 131–137.
51. Rodríguez, E., Calzada, J., Arqués, J.L., Rodríguez, J.M., Núñez, M., Medina, M. 2005. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *Int. Dairy J.* 15, 51–57.
52. Rodríguez, E., Gaya, P., Nuñez, M., Medina, M. 1998. Inhibitory activity of a nisin-producing starter culture on *Listeria innocua* in raw ewes milk Manchego cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 39, 129–132.
53. Rodríguez, E., González, B., Gaya, P., Nuñez, M., Medina, M. 2000. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *Int. Dairy J.* 10, 7–15.
54. Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M. D., Rea, M. C., Lombardi, A., Cogan, T. M., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *Int. J. Food Microbiol.* 11, 621–647.
55. Smit, G., Smit, B. A., Engels, W. J. M. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 591–610.

56. Sousa, M. J., Ardo, Y., McSweeney, P. L. H. 2001. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening *Int. Dairy J.* 11, 327–345.
57. Stiles, M. E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 331–345.
58. Tsakalidou, E., Manolopoulou, E., Kabarakis, E., Zoidou, E., Pot, B., Kersters, K., Kalantzopoulos, G. 1994. The combined use of whole-cell protein extracts for the identification (SDS-PAGE) and enzyme activity screening of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek dairy products. *Syst. Appl. Microbiol.* 17, 444–458.
59. Urbach, G. 1997. The flavor of milk and dairy products. 2. Cheese: contribution of volatile compounds. *Int. J. Dairy Technol.* 50, 79– 89.
60. Van Tyne D, Gilmore, M. S. 2014. Friend turned foe: Evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* Jun 18. [Epub ahead of print].

Table 1 Acidifying activity of *Enterococcus faecium* LJx4 and other LAB strains of dairy origin in HT-RSM (10% w/v; initial pH 6.57) at 30 °C^a.

Strain	6 h		12 h		24 h	
	pH	Titrateable acidity (g 100 mL ⁻¹ lactic acid)	pH	Titrateable acidity (g 100 mL ⁻¹ lactic acid)	pH	Titrateable acidity (g 100 mL ⁻¹ lactic acid)
<i>Enterococcus faecium</i> LJx4	6.09	0.08 ± 0.02 ^{ab}	5.60	0.14 ± 0.02 ^{ac}	5.63	0.18 ± 0.01 ^a
<i>Enterococcus faecalis</i> TAB 28	5.74	0.08 ± 0.01 ^{ab}	4.92	0.44 ± 0.03 ^b	4.51	0.70 ± 0.02 ^b
<i>Enterococcus faecalis</i> TAB 52	6.19	0.05 ± 0.02 ^a	5.92	0.15 ± 0.03 ^c	5.67	0.17 ± 0.02 ^a
<i>Enterococcus durans</i> AZ6	6.03	0.07±0.01 ^a	5.48	0.22 ± 0.04 ^{cd}	5.07	0.31 ± 0.05 ^c
<i>Lactococcus lactis</i> ESI 153	5.43	0.19 ± 0.05 ^c	4.31	0.67 ± 0.05 ^e	4.10	0.71 ± 0.01 ^b
<i>Lactococcus lactis</i> ESI 515	6.19	0.04 ± 0.01 ^a	5.65	0.13 ± 0.02 ^a	4.35	0.54 ± 0.02 ^d
<i>Lactococcus lactis</i> 18-16	5.96	0.14 ± 0.05 ^{bc}	5.36	0.26 ± 0.07 ^d	4.93	0.30 ± 0.11 ^c
<i>Lactococcus lactis</i> E8	5.23	0.36 ± 0.02 ^d	4.34	0.68 ± 0.01 ^e	4.27	0.73 ± 0.01 ^b

^a Values are means ± SD of replicate measurements in duplicate experiments. For each time point, means in a column followed by the same superscript letter did not differ significantly (one-way ANOVA, $p < 0.05$) when compared using the Tukey test. Underlined values indicate that the milk was coagulated.

Table 2 Proteolytic activity of *Enterococcus faecium* LJx4 and other LAB strains of dairy origin in HT-RSM (10% w/v) after 24 h at 30 °C*.

Strain	Proteolytic activity (ΔOD_{340})
<i>Enterococcus faecium</i> LJx4	0.007 ± 0.001^a
<i>Enterococcus faecalis</i> TAB 28	0.286 ± 0.011^b
<i>Enterococcus faecalis</i> TAB 52	-
<i>Enterococcus durans</i> AZ6	-
<i>Lactococcus lactis</i> ESI 153	0.141 ± 0.007^c
<i>Lactococcus lactis</i> ESI 515	-
<i>Lactococcus lactis</i> 18-16	-
<i>Lactococcus lactis</i> E8	0.206 ± 0.003^d

* Proteolytic activity, as the increase in optical density at 340 nm, is expressed as mean values of replicate measurements in duplicate experiments. Means followed by different superscript letter differed significantly (one-way ANOVA, $p = 0.000$) when compared using the Tukey test.

-, The value of the OD_{340} was equal or lower than the control without bacterial culture

Table 3 Specific peptidase activities of cell free extracts of *Enterococcus faecium* LJx4 and other LAB strains of dairy origin on *p*-nitroanilide derivatives of amino acids^a.

Strain	Peptidase activity (nmol pNA mg ⁻¹ protein h ⁻¹)					
	Ala-pNA	Leu-pNA	Lys-pNA	Pro-pNA	Glu-pNA	Gly-Pro-pNA
<i>Enterococcus faecium</i> LJx4	5.39 ± 0.25 ^a	10.56 ± 1.50 ^{ab}	5.50 ± 1.14 ^a	ND	58.92 ± 11.97 ^a	ND
<i>Enterococcus faecalis</i> TAB 28	9.03 ± 7.83 ^a	8.32 ± 0.29 ^a	1.55 ± 1.19 ^a	ND	ND	ND
<i>Enterococcus faecalis</i> TAB 52	15.19 ± 0.76 ^a	9.68 ± 0.42 ^{ab}	2.67 ± 0.11 ^a	ND	ND	ND
<i>Enterococcus durans</i> AZ6	447.27 ± 28.50 ^b	98.46 ± 16.16 ^b	417.44 ± 37.43 ^b	12.45 ± 4.64 ^a	194.48 ± 30.05 ^b	ND
<i>Lactococcus lactis</i> ESI 153	41.02 ± 6.95 ^a	80.06 ± 6.51 ^{ab}	563.04 ± 37.61 ^b	8.97 ± 1.38 ^a	1.06 ± 0.20 ^c	2244.10 ± 21.07 ^a
<i>Lactococcus lactis</i> ESI 515	225.64 ± 35.62 ^c	232.87 ± 55.10 ^c	1401.39 ± 44.18 ^c	9.34 ± 0.84 ^a	249.28 ± 5.60 ^d	3829.86 ± 117.46 ^b
<i>Lactococcus lactis</i> 18-16	128.67 ± 16.87 ^d	429.93 ± 65.67 ^d	1880.47 ± 207.45 ^d	14.43 ± 4.25 ^{ab}	1.72 ± 0.65 ^c	4316.86 ± 27.64 ^c
<i>Lactococcus lactis</i> E8	166.78 ± 4.49 ^d	380.30 ± 19.55 ^d	2470.48 ± 221.11 ^e	21.15 ± 2.86 ^b	24.54 ± 2.06 ^c	3872.66 ± 21.89 ^b
<i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ32	12895.80 ± 880.67	9431.53 ± 1024.74	14416.40 ± 1038.14	227.88 ± 11.55	13.11 ± 0.11	12263.60 ± 1173.65

^a Values presented are means ± SD of triplicate measurements in duplicate experiments for each bacterial test. Means in the same column followed by different letters differ significantly when compared with Kruskal-Wallis tests ($p < 0.05$) and Tukey post hoc tests. Peptidase activities of *Lb. helveticus* CNRZ32 were not included in the analysis.
ND, not detected.

Table 4 Volatile compounds in a model cheese manufactured with *Enterococcus faecium* LJx4 after 28 days at 4°C. Cheese manufactured with *Lactococcus lactis* ESI 153 in the same conditions served as a control. ^aRT Relative abundance (mean \pm SD) of each compound was expressed as the percentage of its peak area to the cyclohexanone peak area.

Volatile compounds	RT ^a	Cheese		P value ^b
		Control	<i>E. faecium</i> LJx4	
<i>Aldehydes</i>				
Acetaldehyde	5.50	0.43 ± 0.15	0.35 ± 0.07	0.602
3-Methylbutanal	12.42	4.19 ± 0.44	0.02 ± 0.01	0.006
Hexanal	23.21	0.65 ± 0.01	0.55 ± 0.03	0.059
<i>Ketones</i>				
2-Propanone	8.08	7.36 ± 1.15	11.17 ± 1.20	0.084
2-Butanone	11.58	2.46 ± 0.18	4.46 ± 0.48	0.277
2-Pentanone	16.05	0.55 ± 0.04	0.22 ± 0.01	0.699
2,3-Heptanodione	28.26	2.00 ± 0.06	0.03 ± 0.02	0.003
2-Heptanone	30.78	1.99 ± 0.04	1.36 ± 0.04	0.008
3-Hydroxy-2-butanone	38.08	5.14 ± 0.08	25.13 ± 8.55	0.008
2-Nonanone	43.90	0.41 ± 0.00	0.22 ± 0.06	0.050
Butyrolactone	55.22	0.92 ± 0.43	0.72 ± 0.05	0.567
<i>Alcohols</i>				
Ethanol	13.76	5.10 ± 0.25	54.36 ± 6.24	0.008
2-Methyl-1-propanol	24.22	0.05 ± 0.01	0.10 ± 0.07	0.465
3-Methyl-1-butanol	32.89	376.18 ± 20.45	0.29 ± 0.03	0.002
3-Methyl-3-buten-1-ol	35.70	0.10 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.008
1-Pentanol	35.78	0.07 ± 0.01	0.12 ± 0.03	0.423
2-Furanmethanol	55.59	0.05 ± 0.00	2.59 ± 0.41	0.013
<i>Esters</i>				
Ethyl acetate	10.93	2.46 ± 0.18	1.25 ± 0.01	0.001
Ethyl butanoate	20.02	0.63 ± 0.05	3.13 ± 0.09	0.001
<i>Hydrocarbons</i>				
Pentane	4.13	0.35 ± 0.01	0.14 ± 0.03	0.009
2-Methylpentane	4.33	0.35 ± 0.01	6.19 ± 0.07	0.001
3-Methylpentane	4.44	0.26 ± 0.01	6.21 ± 0.06	0.000
Heptane	5.39	0.43 ± 0.15	0.42 ± 0.24	0.691
<i>Aromatic compounds</i>				
Toluene	20.18	0.65 ± 0.01	0.59 ± 0.24	0.859
Ethyl benzene	26.51	0.01 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.333
1,2-Dimethyl benzene	27.09	0.09 ± 0.01	0.02 ± 0.03	0.037

1,4-Dimethyl benzene	27.64	0.93 ± 0.04	0.62 ± 0.31	0.302
1,3-Dimethyl benzene	30.85	0.68 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.001
4-Methyl-1-ethyl benzene	33.84	0.50 ± 0.00	0.03 ± 0.02	0.001
<i>Carboxylic and fatty acids</i>				
Acetic acid	46.78	35.13 ± 0.49	2.70 ± 0.34	0.001
Propanoic acid	50.95	0.09 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.083
Butanoic acid	54.47	25.94 ± 0.56	7.82 ± 0.74	0.001
3-Methylbutanoic acid	55.72	0.99 ± 0.18	0.30 ± 0.03	0.034
Hexanoic acid	59.58	20.81 ± 0.78	11.75 ± 2.11	0.029
Heptanoic acid	61.33	0.44 ± 0.25	0.56 ± 0.01	0.550
Octanoic Acid	62.89	12.79 ± 1.55	8.20 ± 1.24	0.082
Nonanoic acid	64.46	2.00 ± 0.28	1.18 ± 0.19	0.076
Decanoic acid	66.21	6.77 ± 3.38	1.58 ± 0.17	0.163
<i>Terpenes</i>				
α -Pinene	18.73	0.12 ± 0.00	0.84 ± 0.35	0.102
D-Limonene	31.78	0.68 ± 0.00	1.75 ± 0.97	0.261

*RT: retention time.

·#One-way ANOVA to determine differences on the relative abundance of volatile compounds between both cheeses.

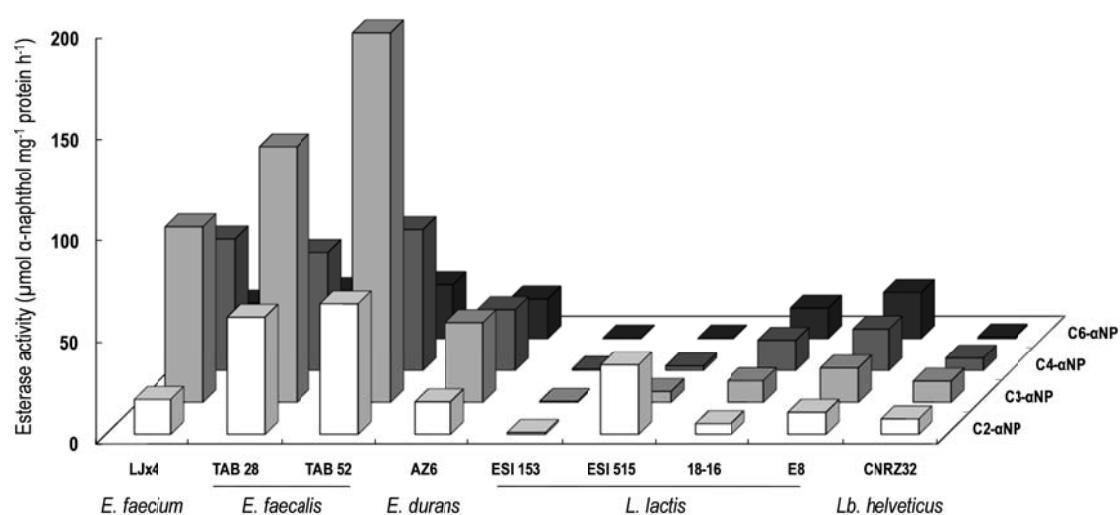


Figure 1. Specific esterase activity in cell free extracts of *E. faecium* LJx4 and other LAB strains of dairy origin, using α -naphthyl derivatives of acetic (C2- α NP), propionic (C3- α NP), butyric (C4- α NP) and caproic (C6- α NP) acids

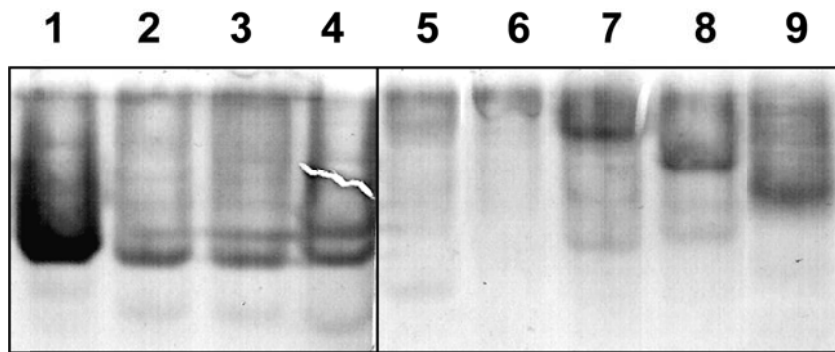


Figure 2. Esterase electrophoretic profiles of *E. faecium* LJx4 and other LAB strains of dairy origin. Line 1, *E. faecium* LJx4; line 2, *E. faecalis* TAB 28; line 3, *E. faecalis* TAB 52; line 4, *E. durans* AZ6; line 5, *L. lactis* ESI 153; line 6, *L. lactis* ESI 515; line 7, *L. lactis* 18-16; line 8, *L. lactis* E8; and line 9, *Lb. helveticus* CNRZ32.

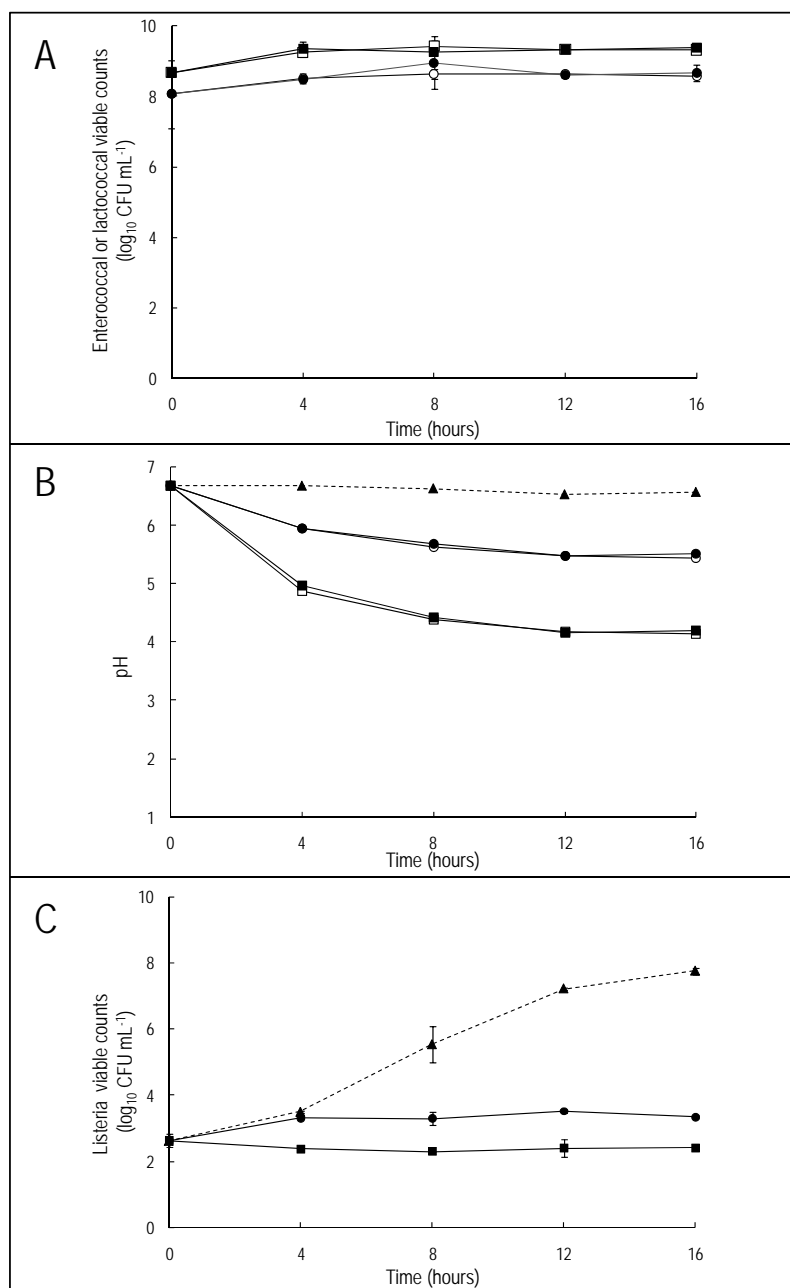


Figure 3. Control of *Listeria* by *E. faecium* LJx4 in a fermented milk model. Evolution of *E. faecium* LJx4 (bacterial counts on KAA agar) and *L. lactis* ESI 153 (bacterial counts on GM17 agar) counts (A), pH (B) and *Listeria* (bacterial counts on PALCAM agar) counts (C) in fermented milk manufactured with *E. faecium* LJx4 or *L. lactis* ESI153. *E. faecium* LJx4 (○), *L. lactis* ESI 153 (□), *E. faecium* LJx4 and *L. innocua* SA1 (●), *L. lactis* ESI 153 and *L. innocua* SA1 (■), and *L. innocua* SA1 (▲).

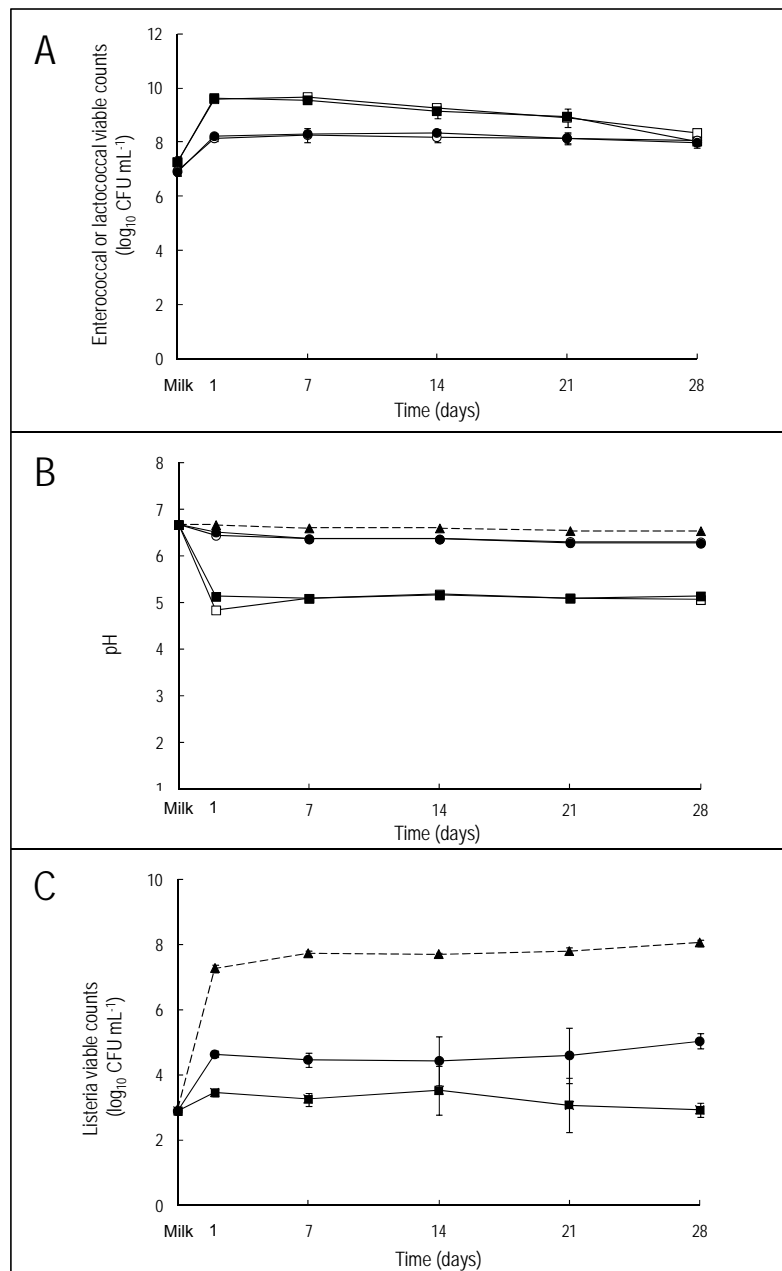


Figure 4. Control of *Listeria* by *E. faecium* LJx4 in an experimental cheese model. Evolution of *E. faecium* LJx4 (bacterial counts on KAA agar) and *L. lactis* ESI 153 (bacterial counts on GM17 agar) counts (A), pH (B) and *Listeria* (bacterial counts on PALCAM agar) counts (C) in cheese model manufactured with *E. faecium* LJx4 or *L. lactis* ESI153. *E. faecium* LJx4 (○), *L. lactis* ESI 153 (□), *E. faecium* LJx4 and *L. lactis* ESI 153 (●), *L. lactis* ESI 153 and *L. innocua* SA1 (■), and *L. innocua* SA1 (▲)

IX. DISCUSIÓN GENERAL

IX.1 Potencial tecnológico de una colección de bacterias aisladas de leche humana

Diversos estudios han demostrado que la existencia de una microbiota específica en la leche humana. Entre las bacterias cultivables que se pueden encontrar en este fluido biológico se encuentran especies pertenecientes a los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Propionibacterium* y *Bifidobacterium* (Heikkilä y Saris, 2003; Jiménez *et al.*, 2008; Martín *et al.*, 2007 y 2009). Hasta el momento se han descrito más de 200 especies de bacterias pertenecientes a unos 50 géneros, entre las que se incluyen incluso algunas nuevas especies como *Streptococcus lactarius* (Martín *et al.*, 2011). Estas bacterias pueden resultar atractivas para la industria láctea ya que, entre otras características, se consumen de forma segura durante un periodo prolongado por la población infantil, además de estar bien adaptadas tanto a la mucosa del tracto gastrointestinal infantil como a los sustratos lácteos (Martín *et al.*, 2004).

Por otra parte, las BAL han estado presentes en el desarrollo de productos fermentados desde tiempos remotos con un largo historial de consumo seguro (Caplice y Fitzgerald, 1999). En sus inicios la fermentación tenía como principal función aumentar la vida útil de las materias primas. Sin embargo, el mercado actual, y en particular el sector lácteo, demanda productos menos procesados, con características organolépticas novedosas y que aporten beneficios específicos a la salud del consumidor. Esto, unido al crecimiento y desarrollo de la tecnología empleada en la elaboración de alimentos fermentados, hace que la industria demande nuevos cultivos iniciadores, adjuntos y probióticos que sirvan para generar productos innovadores con un mayor valor añadido (Pedersen *et al.*, 2005). En este contexto uno de los objetivos de esta Tesis fue evaluar algunas propiedades de interés tecnológico en una colección de bacterias lácticas y bifidobacterias aisladas de leche de mujeres sanas para determinar su utilidad para el desarrollo de productos lácteos fermentados.

La principal función de los cultivos iniciadores es la producción de ácido láctico por fermentación de la lactosa presente en la leche. Esto crea unas condiciones favorables para mejorar la formación de la cuajada, prevenir o inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes mediante la reducción del pH y contribuir al desarrollo de la textura, sabor y aroma característicos de los productos lácteos fermentados (Beresford and William, 2003). Por ello, la producción de ácido y la actividad proteolítica, que se considera necesaria para una adecuada velocidad de crecimiento de la bacteria en leche, son generalmente el primer criterio de selección para los cultivos iniciadores en la industria láctea (Cogan *et al.*, 1997; Settani y Moschetti, 2010). Un buen cultivo iniciador debe reducir el pH de la leche, que inicialmente tiene un valor de 6.6 en condiciones normales, a 5.3 en 6 h a 30°C (Cogan *et al.*, 1997). Además, en la selección de nuevos cultivos se deben tener en cuenta otras propiedades incluyendo las actividades proteolítica, peptidasa y esterasa, el transporte

de oligopéptidos, los mecanismos de resistencia a los bacteriófagos, la producción de bacteriocinas y la utilización de citrato (Doyle *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral indican que, en general, las cepas aisladas de leche humana tienen una actividad acidificante escasa. Esto mismo se observa entre los lactococos aislados de productos lácteos elaborados artesanalmente, en los que una buena actividad acidificante es un rasgo muy poco frecuente (Cogan *et al.*, 1997). De las bacterias de leche humana estudiadas sólo tendrían interés como cultivos iniciadores las cepas de *S. salivarius*, cuya producción de ácido fue muy similar a la de las cepas de *S. thermophilus* empleadas en la industria láctea. En relación a la actividad proteásica, tampoco fue destacable en las cepas aisladas de leche humana, excepto en las cepas de *E. faecalis*.

Sin embargo, las bacterias lácticas con poca actividad acidificante y proteásica son útiles como cultivos adjuntos en la industria láctea (Crow *et al.*, 2001; Georgieva *et al.*, 2009). La microbiota secundaria implicada en las fermentaciones lácticas generalmente no contribuye a la producción de ácido, y en ocasiones ni siquiera crece bien en la leche y/o el producto, pero tienen un importante papel en la maduración de los productos lácteos fermentados (Settanni y Moschetti, 2010). La proteólisis secundaria, que tiene lugar después de la acción del cuajo y es debida principalmente a las peptidasas de la microbiota secundaria, libera pequeños péptidos y aminoácidos que son los principales precursores de compuestos aromáticos y sápidos (Briggiler-Marco *et al.*, 2007; Lynch *et al.*, 1999). Esto explica que algunas cepas de lactobacilos con poca actividad proteinásica pero intensa actividad peptidásica se hayan empleado con éxito en distintas variedades de queso (Van Hoorde *et al.*, 2010). Los cultivos adjuntos pueden contribuir a diferenciar los productos, especialmente aquellos que tienen un corto periodo de maduración, gracias a esta mayor actividad proteolítica que potencia el desarrollo del sabor y aroma (Braghieri *et al.*, 2015).

En general, la actividad peptidásica más intensa registrada en las bacterias de leche humana analizadas se detectó entre las cepas de *S. salivarius* y *L. salivarius*. De todas ellas destacó *S. salivarius* ZL49-18, cuyos valores de actividad aminopeptidásica fueron semejantes a los de *L. helveticus* CNRZ32, una cepa utilizada comercialmente como cultivo adjunto para queso (Broadbent *et al.*, 2011; Christiansen *et al.*, 2008). Precisamente, ambas cepas tuvieron iguales valores de actividad X-prolildipeptidil aminopeptidasa, que libera dipéptidos conteniendo prolina a partir de oligopéptidos, una de las actividades peptidásicas de mayor interés para reducir el amargor en los productos lácteos (Barry *et al.*, 2001). Es importante señalar que *L. helveticus* CNRZ32 es auxótrofa para 14 aminoácidos y que posee un complejo sistema proteolítico que incluye una proteinasa extracelular asociada a la pared celular, sistemas especializados de transporte para péptidos y una gran dotación de peptidasas intracelulares para obtener los aminoácidos que requiere para su crecimiento (Broadbent *et al.*, 2011). Este sistema proteolítico también está implicado en la

formación de péptidos bioactivos durante la fermentación de productos lácteos (Griffiths and Tellez, 2013).

Otras funciones importantes para el desarrollo del aroma son las actividades asociadas a las lipasas y esterases. Estas enzimas son capaces de sintetizar e hidrolizar ésteres, dependiendo de los sustratos disponibles y las condiciones ambientales (Holland *et al.*, 2005;). Los resultados de la actividad lipolítica ensayada fueron dependientes de cepa, siendo en general la especie *St. salivarius* la que presentó los valores más altos y destacando, nuevamente, la cepa *St. salivarius* ZL49-18 para todos los sustratos ensayados. *Lactobacillus salivarius* PS2 también destacó con relación al acetato.

Por otra parte, las esterases de las BAL también tienen una influencia notable en la lipólisis de los productos lácteos fermentados y, por tanto, en su sabor. Estas esterases no solo hidrolizan la grasa de la leche liberando ácidos grasos libres, sino también pueden catalizar reacciones de transferencia entre ésteres y glicéridos contribuyendo a la formación de distintos ésteres (Abeijón *et al.*, 2009; Holland *et al.*, 2005; Pedersen *et al.*, 2013; Sumby *et al.*, 2010). Por ello, existe un gran interés en la detección y selección de cepas con actividades enzimáticas que permitan controlar la biosíntesis de compuestos volátiles y diversificar así el aroma en los quesos (Williams *et al.*, 2002; Smit *et al.*, 2004; Amárita *et al.*, 2006; Fernández de Palencia *et al.*, 2006; Kieronczyk *et al.*, 2006; Brandsma *et al.*, 2008). Las cepas pertenecientes a la especie *S. salivarius* y, en concreto *S. salivarius* ZL49-18, también destacaron en relación con la actividad esterásica con todos los sustratos ensayados, que fue superior a la del resto de cepas analizadas. En cuanto a los lactobacilos, la mayoría de las cepas de *L. gastricus* fueron muy activas liberando propionato, butirato y caproato.

S. salivarius es un miembro relevante de la microbiota oral y también se encuentra con frecuencia asociado a la del intestino delgado (Chen y Jiang, 2014; van der Bogert *et al.*, 2013). Recientemente se ha descrito un amplio repertorio de efectos beneficiosos para la salud asociados a cepas pertenecientes a esta especie, que no se limitan a la cavidad oral (Burton *et al.*, 2006; Wescombe *et al.*, 2012). La especie *S. salivarius* está estrechamente relacionada con *S. thermophilus*, esta última no se encuentra normalmente asociada a las mucosas humanas, sino a la mucosa de la glándula mamaria bovina. De hecho, *S. thermophilus* es un componente habitual de los cultivos iniciadores empleados en la elaboración de yogur y algunos quesos de pasta cocida (Pombert *et al.*, 2009).

Algunas de las cepas de *S. salivarius* y *L. salivarius* aisladas de leche humana analizadas en este estudio tienen actividades enzimáticas prometedoras para su utilización como cultivos iniciadores o adjuntos en la industria láctea. Sin embargo, será necesario definir qué influencia tienen en la calidad global de los productos fermentados obtenidos.

Por otra parte, el análisis global de las actividades enzimáticas analizadas en este trabajo reveló que la gran variabilidad observada estaba muy asociada con el grupo taxonómico al que pertenecía la cepa pero no con su origen (leche humana u otros orígenes).

IX.2 *L. gastricus*, un nuevo actor en la industria láctea

El género *Lactobacillus* es el más extenso y heterogéneo dentro de las BAL, incluyendo más de 152 especies conocidas hasta la fecha (Salveti *et al.*, 2012). Los lactobacilos juegan un papel crucial en la tecnología de los productos lácteos (queso, yogur y leche fermentada) con una larga historia documentada de uso en alimentos. En los últimos años, con el desarrollo de la genómica, se ha ampliado el conocimiento científico sobre el metabolismo y función de los lactobacilos. Estos avances han abierto el camino a un mayor control de los procesos de fermentación y un aumento de sus aplicaciones industriales como cultivos iniciadores y/o adjuntos (Chamba y Irlinger, 2004). Además de su importancia tecnológica, las propiedades probióticas de ciertas cepas refuerzan el creciente interés de la industria láctea por este género.

L. gastricus es una de las especies menos estudiadas del género *Lactobacillus*. Fueron aislados por primera vez en 2003, a partir de muestras de la mucosa gástrica de humanos sanos (Roos *et al.*, 2005). Recientemente se han aislado también de muestras de leche humana (Martín *et al.*, 2011). Su posible explotación por parte de la industria alimentaria requiere la caracterización bioquímica y tecnológica de las cepas. Además, sería importante conocer si algunas cepas de esta especie poseen propiedades probióticas que puedan ser de interés para su empleo en la elaboración de alimentos funcionales. Por este motivo, en esta Tesis se llevó a cabo la caracterización de una colección de cepas de *L. gastricus* aisladas de leche humana, una especie prácticamente desconocida, para evaluar su posible inclusión en nuevos alimentos. Para ello se estudiaron varias propiedades tecnológicas como su capacidad para crecer en la leche, su actividad acidificante, su actividad proteolítica y otras actividades enzimáticas. También se analizaron algunas propiedades probióticas como su potencial antimicrobiano y su resistencia a las condiciones del tracto gastrointestinal. Además, se evaluó su seguridad mediante la determinación de su capacidad de producción de aminos biógenos y su sensibilidad a los antibióticos.

Las siete cepas estudiadas crecieron mejor en un medio a base de leche que en un medio de cultivo comercial (MRS-C) específico para el crecimiento de BAL, lo que sugiere requerimientos nutricionales complejos. Sin embargo ninguna de ellas mostró una capacidad acidificante suficiente como para su posible uso como cultivo iniciador. Su actividad proteolítica, requerida para un crecimiento bacteriano adecuado, fue comparable a la de algunos lactobacilos probióticos que se comercializan añadidos a

quesos o a la de algunas cepas de lactococos y enterococos aisladas de quesos artesanales (Delgado y Mayo, 2002; Ong *et al.*, 2007).

La actividad metabólica de las BAL contribuye al sabor, textura, valor nutritivo, propiedades bioactivas y seguridad microbiológica de los productos lácteos fermentados (Settani y Moschetti, 2010). Una prospección inicial del potencial metabólico de las cepas de *L. gastricus* estudiadas en esta Tesis Doctoral reveló recursos enzimáticos que les permitiría el uso de los principales componentes de la leche, tales como lípidos (esterasa, esterasa-lipasa), proteínas (leucina arilamidasa, la actividad de tipo tripsina) y carbohidratos (glucosidasas, galactosidasas), y un suministro adecuado de fósforo (fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa). El análisis detallado de las actividades peptidasa, esterasa y glucolíticas mostró una amplia variabilidad dependiente de la cepa.

Con relación al perfil proteolítico *L. gastricus* ZL33-26 mostró una alta actividad X-prolildipeptidil-aminopeptidasa (XPDAP), que libera específicamente, como se indicó anteriormente, X-Pro dipéptidos desde el extremo N-terminal. La acción combinada de XPDAP y aminopeptidasas generales permite la degradación de oligopéptidos ricos en prolina caracterizados por un sabor amargo. Estos oligopéptidos son el resultado de la acción de proteinasas de la pared celular sobre las caseínas y suelen ser indeseables en los productos lácteos (Barry *et al.*, 2001).

Los sustratos preferidos para las esterases de las BAL son generalmente ésteres de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente C4 y C6, en concordancia con los resultados obtenidos en este trabajo (Holland *et al.*, 2005). Los AGCC libres tienen un umbral de percepción relativamente bajo y contribuyen al sabor típico del queso, especialmente el ácido butírico, uno de los más frecuentes. Los ésteres de estos AGCC tienen un umbral de percepción más bajo dan lugar a un aroma afrutado en algunas variedades de quesos (Liu *et al.*, 2004; Walstra y Jenness, 1984).

Las β -glucosidasas están ampliamente distribuidas entre las BAL y están involucradas en la liberación de compuestos volátiles a partir de sus precursores glucosídicos (Spano *et al.*, 2005; Pérez-Martín *et al.*, 2012; Pérez-Martín *et al.*, 2013). En este trabajo, la actividad β -glucosidasa de las cepas de *L. gastricus* se detectó en las células enteras, mientras que los extractos intracelulares sólo mostraron una actividad residual; este resultado es esperable ya que en los lactobacilos, suele estar íntimamente unida a las células (Pérez-Martín *et al.*, 2012).

Los carbohidratos complejos presentes en los alimentos de origen vegetal no pueden ser metabolizados por los seres humanos. En cambio, las glucosidasas bacterianas sí son capaces de digerirlos y convertirlos a AGCC valiosos para el huésped (Mahajan *et al.*, 2012). Los seres humanos son deficientes en α -galactosidasa pancreática y no hidrolizan los α -galactósidos, tales como la rafinosa, la estaquiosa, la verbascosa o la melibiosa, causando malestar gastrointestinal debido a una

acumulación anormal de gas. La notable actividad α -galactosidasa detectada en la cepa *L. gastricus* ZL69-21B es una propiedad valiosa para el desarrollo de productos a base de soja (Carrera-Silva *et al.*, 2006; Silvestroni *et al.*, 2002; Yoon y Hwang, 2008). Aunque la información actualmente disponible sobre la función de la α -glucosidasa no es muy abundante, generalmente se asocia con la digestión de prebióticos como los isomalto-oligosacáridos (Møller *et al.*, 2012). En esta Tesis Doctoral, *L. gastricus* ZL71-21 y *L. gastricus* ZL89-23 fueron las cepas que mostraron una mayor actividad α -glucosidasa. Por otro lado, la actividad β -glucosidasa está implicada en la hidrólisis de isoflavonas, glucósidos que se encuentran de forma natural en algunos alimentos como la soja, aumentando su biodisponibilidad en la leche de soja fermentada (Chun *et al.*, 2008; Di Cagno *et al.*, 2010; Donkor y Shah, 2007). El consumo de isoflavonas se ha relacionado con una menor incidencia de los síntomas asociados a la premenopausia (Vitale *et al.*, 2013).

El control de microorganismos indeseables por parte de las BAL se relaciona con la producción de diversas sustancias con actividad antimicrobiana, como los ácidos orgánicos, las bacteriocinas, el peróxido de hidrógeno y/o la reuterina (Gálvez *et al.*, 2010). Las cepas de *L. gastricus* estudiadas inhibieron el crecimiento de todos los organismos indicadores probados, incluyendo la levadura *Kluyveromyces marxianus* CECT 10357. Este hecho fue probablemente debido a la producción de ácidos orgánicos (láctico y/o ácido acético) ya que en esta Tesis Doctoral no se detectó la síntesis de otros compuestos antimicrobianos por parte de las cepas evaluadas.

Algunos lactobacilos aislados de la leche humana han demostrado un potencial probiótico similar e, incluso, superior al de otras cepas utilizadas en productos probióticos comerciales (Arbolea *et al.*, 2011; Arroyo *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2006; Zacarías *et al.*, 2011). Los probióticos administrados por vía oral deben sobrevivir a las condiciones de estrés a las que se van a enfrentar durante el tránsito por el tracto gastrointestinal, especialmente el pH ácido en el compartimento gástrico y la presencia de sales biliares. Además, es deseable su adhesión a células epiteliales del intestino (O'Sullivan *et al.*, 2005). Las cepas de *L. gastricus* aisladas de la leche humana sobrevivieron a pH ácidos y a concentraciones de hasta un 0,5% de sales biliares porcinas cuando estaban vehiculadas en leche y también mostraron capacidad de adhesión *in vitro* a mucinas. En consecuencia, mostraron un elevado potencial para sobrevivir y colonizar el tracto gastrointestinal.

Además de la correcta identificación de la especie y la cepa, la evaluación de la seguridad debe incluir el perfil de sensibilidad a los antimicrobianos y el análisis de actividades metabólicas potencialmente perjudiciales para el huésped. Respecto a la resistencia a los antibióticos, tres de las siete cepas de *L. gastricus* ensayadas mostraron valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) superiores a los puntos de corte establecidos por la EFSA para las especies heterofermentativas de *Lactobacillus* para la kanamicina (64 mg mL⁻¹), la estreptomycin (128 mg mL⁻¹) y la

eritromicina (1 mg ml^{-1}) (EFSA, 2012). Sin embargo, ya que no hay valores de corte oficiales para *L. gastricus*, no podemos en la actualidad categorizar estas tres cepas como resistentes o susceptibles. La resistencia inherente a los aminoglucósidos, como la kanamicina y la estreptomina, es común en lactobacilos y es debida a un fallo en el transporte de los antibióticos ya que carecen de sistemas de transporte de electrones dependiente de oxígeno o nitrato- (Elkins y Mullis, 2004; Gueimonde *et al.*, 2013). Los altos valores de CMI para la vancomicina en estas cepas de *L. gastricus* indican una posible resistencia intrínseca relacionada con la estructura del peptidoglicano, también característica de muchas especies de lactobacilos. La presencia de β -glucuronidasa y la capacidad productora de aminas biógenas se consideran características indeseables (Sanders *et al.*, 2010). Ninguna de las cepas *L. gastricus* estudiada mostraron actividad de β -glucuronidasa o capacidad para formar tiramina, histamina, putrescina y cadaverina.

En el pasado, la producción del isómero D(-) del ácido láctico se consideraba como una propiedad a tener en cuenta para la evaluación de la seguridad de los probióticos, especialmente para su uso en la población infantil (Sanders *et al.*, 2010). Sin embargo, desde el punto de vista científico, se trata de una propiedad prácticamente irrelevante para determinar la seguridad de un aislado ya que muchas de las especies autóctonas del tracto gastrointestinal humano, incluyendo algunas ampliamente empleadas como probióticos en pediatría (p. ej. *L. reuteri*), producen ácido D-láctico. También es ampliamente aceptado que la ingestión de yogur, que contiene elevadas concentraciones de este isómero debido a la actividad de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, no supone un riesgo para la salud infantil. En este sentido, todo parece indicar que no existe ninguna razón para evitar el uso como probióticos de lactobacilos autóctonos humanos sobre la base de los estereoisómeros del ácido láctico que producen (ISAPP, 2003). De hecho, hasta la fecha, no se ha descrito ningún caso de acidosis por ácido D-láctico en ningún ser humano sano, independientemente de su edad (Connolly y Lönnerdal, 2004). Los ensayos clínicos en los que se han administrado cepas probióticas productoras de D-lactato a niños a término y prematuros han revelado que no se produce ningún signo de acidosis, incluso tras su administración diaria durante los primeros 12 meses de vida (Connolly y Lönnerdal, 2004; Connolly *et al.*, 2005). En este sentido, este tipo de acidosis sólo se presenta cuando coinciden los siguientes requisitos: (a) síndrome de intestino corto; (b) consumo de grandes cantidades de carbohidratos; (c) malabsorción de carbohidratos con un aumento de nutrientes en el colon; (d) sobrecrecimiento de bacterias productoras de D-lactato de la propia microbiota; (e) motilidad colónica disminuida; y (f) alteración en el metabolismo del ácido D-láctico (Hove, 1998; Uribarri *et al.*, 1998). En general, la producción de este isómero por parte de las cepas de *L. gastricus* estudiadas en esta Tesis fue baja, a excepción de la cepa ZL118-22.

Obviamente, la estabilidad y la viabilidad bacteriana son un desafío para la producción de cultivos comerciales para la industria alimentaria. Estos cultivos deben

mantenerse estables durante todo el procesamiento, manejo y almacenamiento propio y del alimento al que se añaden. La refrigeración, la congelación y la liofilización son las tecnologías de conservación industriales más comunes aplicadas a los cultivos bacterianos. La capacidad de las cepas de *L. gastricus* para sobrevivir en leche durante el almacenamiento en frío (8 ó 3 °C) se limitó a una o dos semanas para la mayoría de las cepas; en contraste, el almacenamiento en congelación (-20 ó -80 °C) utilizando leche desnatada en polvo como crioprotector se asoció con una alta viabilidad de las cepas hasta un máximo de seis meses. La recuperación de los cultivos de *L. gastricus* inmediatamente después de la liofilización fue elevada. Las condiciones de almacenamiento de los liofilizados jugaron un papel importante en la viabilidad de las bacterias. Así, cuando éste tuvo lugar en una atmósfera libre de oxígeno y a temperatura de refrigeración (5 °C) se mantuvo la viabilidad celular mientras que, a temperatura ambiente (condiciones preferidas por el menor coste de distribución y comercialización), disminuyó significativamente.

Tras la caracterización inicial de esta colección de cepas de *L. gastricus* aisladas de leche humana, la cepa *L. gastricus* ZL35-21 (PS3) fue seleccionada en base a algunos rasgos de relevancia probiótica y tecnológica, con el fin de obtener un mayor conocimiento sobre estas propiedades. Para ello, se procedió a la secuenciación completa de su genoma utilizando la plataforma de pirosecuenciación 454.

Se detectaron genes que codifican más de 20 peptidasas y proteasas, además de varios sistemas de transporte para péptidos. Este sistema proteolítico complejo permitiría el crecimiento en la leche y compensar las deficiencias en la biosíntesis de aminoácidos. Conviene destacar que se detectaron genes que codifican tres glutamato-cisteína ligasas diferentes (PS3_6383, PS3_8988 y PS3_21018), relacionadas con la biosíntesis de γ -glutamylcisteína. Este compuesto se encuentra en algunas BAL y su principal función es la protección frente al estrés oxidativo (Kim *et al.*, 2008). Además, se identificó un gen que codifica una glutamato descarboxilasa (PS3_14606). Esta enzima cataliza la síntesis de ácido γ -aminobutírico, un aminoácido que contribuye a la resistencia bacteriana a los ácidos y tiene potencial como compuesto bioactivo en los seres humanos (Gobbetti *et al.*, 2010). También se identificaron genes que codifican sistemas de transporte y enzimas relacionadas con la utilización de diversos hidratos de carbono tales como fructosa, galactitol, manosa, lactosa, celobiosa, sacarosa y β -glucósidos, así como genes que codifican dos esterasas y una enzima lipolítica de la familia GDSL.

IX.3 *L. fermentum* CECT 5716: acuerdo entre el genoma y algunas propiedades fenotípicas

Como se ha comentado anteriormente, la leche humana contiene una cierta diversidad de BAL y se ha comprobado en numerosas ocasiones que varias cepas de diferentes especies tienen un potencial considerable como probióticos (Arboleya *et al.*,

2011; Arroyo *et al.*, 2010, Jiménez *et al.*, 2008; Martín *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2006). Una de las más cepas mejor caracterizadas es *L. fermentum* CECT 5716 ya que, debido a su amplio repertorio de propiedades deseables, resulta muy atractiva para aplicaciones comerciales (Martín *et al.*, 2005a.; Olivares *et al.* 2006).

En esta Tesis Doctoral se evaluó la relación entre el genotipo y el fenotipo de *L. fermentum* CECT 5716 con respecto a algunos rasgos específicos. Los lactobacilos se han considerado durante mucho tiempo parte de la barrera microbiológica frente a la infección por patógenos y, en este sentido, la producción de sustancias inhibidoras, tales como ácidos orgánicos, bacteriocinas o peróxido de hidrógeno puede ser una propiedad relevante. En esta Tesis, se comprobó que *L. fermentum* CECT 5716 fue capaz de producir ácido láctico y ácido acético pero no bacteriocinas o peróxido de hidrógeno. Esto concuerda con su genoma ya que no contiene genes implicados en la biosíntesis de sustancias antimicrobianas distintas de los ácidos orgánicos. Por ello, los mecanismos implicados en la actividad antimicrobiana de esta cepa deben ser la producción de tales ácidos y/o procesos de exclusión competitiva. De hecho, *L. fermentum* CECT 5716 tiene la capacidad de inhibir el crecimiento o la adhesión a las mucinas de un amplio espectro de bacterias potencialmente patógenas (Martín *et al.*, 2005a; Olivares *et al.*, 2006) y aumenta la supervivencia de los ratones infectados con *Salmonella* spp. (Olivares *et al.*, 2006). La función protectora que ejerce esta cepa se ha demostrado en un modelo murino de *shock* séptico (Arribas *et al.*, 2009). Un ensayo en niños de 6 meses de edad condujo a una reducción significativa en la incidencia de infecciones intestinales y respiratorias (Maldonado *et al.*, 2012).

Los lactobacilos heterofermentativo estrictos, como *L. fermentum*, producen CO₂, etanol, acetato y lactato a partir del metabolismo de la glucosa, un hecho que se refleja claramente en el genoma de *L. fermentum* CECT 5716. Aunque supuestamente la vía catabólica primaria del metabolismo de la glucosa en el género *Lactobacillus* es la vía glucolítica, los genes *pfk* y *fba* que codifican la 6-fosfofructoquinasa y la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, respectivamente, están ausentes en el genoma de *L. fermentum* CECT 5716. La ausencia de dichos genes, esenciales para la ruta glucolítica, puede ser una característica específica de los lactobacilos heterofermentativos (Morita *et al.*, 2008). Por otro lado, *L. fermentum* CECT 5716 contiene los genes de todas las proteínas implicadas en la ruta de las pentosas fosfato, lo que indica que es el mecanismo que utiliza para metabolizar la glucosa, un hecho observado previamente en los genomas de *L. reuteri* JCM 1112 y *L. fermentum* IFO 3956 (Morita *et al.*, 2008).

L. fermentum CECT 5716 mostró una actividad α -galactosidasa (necesaria para la hidrólisis de α -galacto-oligosacáridos) particularmente alta. Estos compuestos están presentes en las legumbres y pueden causar trastornos gastrointestinales debido a la carencia de esta enzima en el intestino delgado de los mamíferos. En un estudio previo, LeBlanc *et al.* (2005) encontraron que *L. fermentum* CRL 722 poseía una actividad α -

galactosidasa que ejercía su acción *in vivo* en el intestino delgado de ratas. Más tarde, se demostró que esta cepa fue capaz de superar la deficiencia de α -galactosidasa, ya que reducía el hidrógeno excretado en ratas que consumen α -galacto-oligosacáridos de soja (LeBlanc *et al.* 2008). Esta observación ofrece perspectivas interesantes para la aplicación de BAL como vectores de estas enzimas digestivas.

Por otra parte, en este estudio se ha confirmado que *L. fermentum* CECT 5716 es capaz de producir glutatión, tal y como se había descrito previamente (Peran *et al.*, 2006). Este hecho, poco común entre los lactobacilos, se relaciona con la presencia de genes implicados en la biosíntesis de este compuesto. El glutatión participa activamente en los mecanismos antioxidantes de la mucosa intestinal, preservándola del daño tisular oxidativo. Se ha demostrado que varios antioxidantes, tales como los flavonoides o la vitamina E, tienen actividad antiinflamatoria al restaurar los niveles de glutatión en la mucosa colónica de ratas en las que se había inducido colitis experimentalmente (González *et al.*, 2001; Camuesco *et al.*, 2004). Diferentes estudios han puesto de manifiesto la asociación entre un contenido bajo de glutatión y las enfermedades inflamatorias intestinales (Miralles-Barrachina *et al.*, 1999) y los beneficios de la suplementación con glutatión en modelos experimentales de colitis (Ardite *et al.*, 2000; Loguercio *et al.*, 2003). En este sentido, *L. fermentum* CECT 5716 ha mostrado un fuerte efecto antiinflamatorio en un modelo murino de colitis inducida por ácido trinitro-2,4,6-bencenosulfónico (TNBS) (Peran *et al.*, 2006). Estos autores sugirieron que la prevención frente al daño oxidativo generado por el TNBS en el colon fue debida a la inhibición de la infiltración de leucocitos por parte del probiótico. El efecto antiinflamatorio intestinal de esta cepa se asoció con una restauración de los niveles de glutatión en el colon en comparación con las ratas colíticas no tratadas. De hecho, estos autores concluyeron que las propiedades antioxidantes atribuidas al glutatión producido por *L. fermentum* CECT 5716 fueron cruciales en su efecto antiinflamatorio. Otras cepas de *L. fermentum* (E-3 y E-18) también poseen un elevado potencial antioxidante (Kullisaar *et al.*, 2002).

Tradicionalmente, las BAL se han considerado grandes consumidoras de vitaminas del grupo B. Sin embargo, varios estudios han demostrado que algunas cepas específicas son capaces de sintetizar folato (Sybesma *et al.*, 2003; LeBlanc *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2008), riboflavina (Martín *et al.*, 2010; Jayashree *et al.*, 2011) y/o cobalamina (Taranto *et al.*, 2003; Martín *et al.*, 2005). En esta Tesis, se observó que *L. fermentum* CECT 5716 produce riboflavina y folato aunque no cobalamina. No se conoce la contribución de la microbiota a los requerimientos de folato necesarios para la renovación celular del epitelio intestinal. Sin embargo, se ha descrito la existencia de un mecanismo para la absorción de folato luminal en las células del colon humano (Dudeja *et al.*, 2001), lo que sugiere que el folato producido *in situ* por la microbiota del colon puede ser utilizado por las células de este epitelio. De hecho, se ha demostrado que el folato de origen bacteriano se absorbe a lo largo del intestino grueso y es incorporado al hígado y riñones de lechones (Asrar y O'Connor, 2005). *L.*

fermentum CECT 5716 fue aislado originalmente de la leche humana y, en este sentido, es interesante observar que la administración oral de leche humana a ratas aumenta la concentración de folato en plasma y en el contenido fecal total en un 42 y 48%, respectivamente (Krause *et al.*, 1996). Estos autores sugirieron que este aumento en los niveles de folato en las ratas alimentadas con leche humana se debía, al menos en parte, al aumento de la síntesis de folato por parte de los microorganismos productores presentes en el ciego y colon. La disponibilidad creciente de genomas ha permitido no sólo la identificación de cepas probióticas productoras de vitaminas sino también la comprensión de los mecanismos implicados en su biosíntesis. Este hecho podría explotarse en el futuro para aumentar la producción y biodisponibilidad de vitaminas en el tracto gastrointestinal humano (LeBlanc *et al.*, 2013).

Entre las BAL, *L. reuteri* fue la primera especie en la que se describió la capacidad para producir cianocobalamina (Taranto *et al.*, 2003) seguida de *Lactobacillus coryniformis* (Martín *et al.*, 2005). Recientemente el análisis del genoma de *L. reuteri* JCM 1112 mostró la presencia de varios genes (*cbi*, *cob* y *hem*) relacionados con la producción de vitamina B₁₂ (Morita *et al.*, 2008). La comparación del genoma de esta cepa con el de *L. fermentum* IFO 3956 reveló que ese grupo de genes se inserta en una secuencia común a ambas bacterias (y también presente en *L. fermentum* CECT 5716), lo que sugiere que este grupo constituye un islote genómico adquirido por transferencia lateral de genes.

L. fermentum CECT 5716 mostró valores de CMI para los antibióticos ensayados menores o iguales a los puntos de corte establecidos por la EFSA (2012). Sin embargo, el análisis genómico reveló varias secuencias relacionadas con la resistencia a antibióticos. Entre ellos, se detectaron tres bombas de eflujo de múltiples fármacos, dos β -lactamasas, cuatro determinantes de resistencia a las fluoroquinolonas, y cuatro asignadas a proteínas de protección ribosomal relacionadas con la resistencia a la tetraciclina. Sin embargo, ninguno de estos genes se correlacionó con un fenotipo de resistencia a antibióticos. Este hecho puede explicar la susceptibilidad de la cepa a la tetraciclina y otros antibióticos. La presencia de genes que muestran homología con genes de resistencia a tetraciclina no es raro, ya que los factores implicados en la elongación y en la traducción están relacionados con estas proteínas de protección del ribosoma (Connell *et al.*, 2003).

El análisis del genoma de *L. fermentum* CECT 5716 con la base de datos RAST reveló la presencia de 4 marcos de lectura abierta (ORFs) relacionados con la resistencia a fluorquinolonas: *parE*, *parC*, *gyrA* y *gyrB*. Sin embargo, estos genes pueden ser necesarios para la replicación del ADN y no tener una relación directa con la resistencia a antibióticos. Precisamente, ya se ha descrito la existencia de lactobacilos con valores de CMI elevados frente al ciprofloxacino, inhibidor de la síntesis de ADN (Katla *et al.*, 2001; Danielsen y Wind, 2003).

Muchas especies de BAL utilizan bombas de eflujo como sistema de desintoxicación celular (Piddock, 2006), por lo que podrían tener un papel fisiológico en diversos procesos celulares sin estar necesariamente asociadas con la resistencia a antibióticos. Por último, los marcos de lectura abiertos que codifican β -lactamasas y otras proteínas de unión a penicilina en *L. fermentum* CECT 5716 también pueden estar involucrados en la biosíntesis de peptidoglicano. Globalmente, *L. fermentum* CECT 5716 se puede considerar una cepa segura ya que no se detectó en su genoma ningún gen trasmisible que confiera resistencia a antibióticos.

L. fermentum CECT 5716 estimuló moderadamente la expresión de la proteína de membrana B7-2 y del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II en un modelo *in vitro* con células dendríticas de ratón. En un trabajo previo empleando el mismo modelo, *L. salivarius* CECT 5713 mostró mejores resultados. Este hecho puede deberse a que su genoma contenía genes implicados en procesos de mimetismo molecular mediados por células dendríticas y que dichos genes no se han encontrado en el genoma de *L. fermentum* CECT 5716 (Langa *et al.*, 2012).

En conclusión, los resultados de este trabajo proporcionan asociaciones sobre la relación entre algunas propiedades fenotípicas de *L. fermentum* CECT 5716 y su base molecular subyacente. El análisis *in silico* ha demostrado ser eficaz en la predicción de propiedades beneficiosas específicas de esta bacteria probiótica ya que todos los fenotipos evaluados estaban íntimamente correlacionados con la presencia de los genes o grupos de genes específicamente implicados. La genómica funcional ofrece nuevas perspectivas para entender los mecanismos por los cuales algunas cepas proporcionan un efecto beneficioso al hospedador y en consecuencia la evaluación y la búsqueda de nuevas cepas probióticas.

IX.4 El queso como vehículo para la administración de *L. salivarius* probióticos

El queso se ha considerado una excelente alternativa a las leches fermentadas y yogures como vehículo de microorganismos probióticos (Vinderola *et al.*, 2000; Ong *et al.*, 2007). Una de sus ventajas es su capacidad tampón, ya que protege a los probióticos del ambiente ácido del estómago. Además, su estructura de gel, su alto contenido de grasa y su consistencia sólida también contribuyen a la protección del probiótico (Cruz *et al.*, 2009; Ong *et al.*, 2006; Ong *et al.*, 2006; Butiri *et al.*, 2005). Sin embargo, el comportamiento del probiótico así como su incidencia en las características del producto final dependerán de las cepas utilizadas. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue comprobar la viabilidad de dos cepas de lactobacilos aisladas de leche humana después de su incorporación a la cuajada y evaluar su impacto en el producto final.

Teóricamente, las bacterias probióticas podrían añadirse directamente a la leche y/o incorporarse en una etapa posterior durante la fabricación del queso. En un estudio previo empleando diferentes combinaciones de lactobacilos y bifidobacterias para la elaboración de queso Cheddar, las cepas probióticas se inocularon al mismo tiempo que el cultivo iniciador; aunque se observó una pérdida notable de los probióticos en el suero, el recuento final en todos los quesos fue aceptable ($8-9 \log_{10}$ ufc/g) (Ong *et al.*, 2006). En ensayos preliminares realizados durante esta Tesis Doctoral, al inocular la leche con *L. salivarius* CECT 5713 y *L. salivarius* PS2 al mismo tiempo que el cultivo iniciador sólo se retuvo en la cuajada una pequeña cantidad de las cepas probióticas, perdiéndose la mayor parte en el suero. No obstante, la adición de los lactobacilos probióticos a la cuajada, una vez que la mayor parte del suero había sido retirada y antes del moldeado, se tradujo en una mejora de la retención de los lactobacilos en el queso.

En cualquier alimento probiótico, las cepas probióticas incorporadas deben mantener su viabilidad en concentraciones adecuadas hasta el final de su vida útil. En esta Tesis, las dos cepas de *L. salivarius* permanecieron viables en los quesos experimentales después de 28 días a 4°C. Además, la calidad higiénica del producto final fue adecuada y no se detectó crecimiento de ninguna otra bacteria en los medios de cultivo utilizados. *L. salivarius* CECT 5713 presenta actividad antimicrobiana frente a bacterias potencialmente patógenas y dicha actividad se ha relacionado con la producción de compuestos tales como lactato, acetato y peróxido de hidrógeno (Martín *et al.*, 2006).

En general se considera que la dosis mínima para que un probiótico sea eficaz es de 10^8-10^9 ufc/día (Cruz *et al.*, 2009; Talwalkar *et al.*, 2004). Esto equivaldría a una ingesta diaria de 100 g de un producto que contenga una concentración de probióticos de 10^6-10^7 ufc/g. El recuento de *L. salivarius* CECT 5713 y *L. salivarius* PS2 en los quesos siempre se encontró en el rango recomendado y, por lo tanto, los quesos elaborados cumplirían con el criterio establecido para un alimento probiótico. Además, la presencia de estas cepas probióticas no interfirió con la función del cultivo iniciador, como ha sido descrito anteriormente por otros autores (Ong *et al.*, 2007).

Otro reto asociado a la adición de bacterias probióticas durante la fabricación de queso es intentar que sus características sean similares a las del producto tradicional. De hecho, las propiedades sensoriales, y especialmente el sabor, de cualquier alimento probiótico debe resultar atractivo para el consumidor (Bruhn *et al.*, 2002). La adición de bacterias viables, y sus correspondientes enzimas, probablemente contribuyan a los procesos de glicólisis, proteolisis y lipólisis que tienen lugar durante la fabricación y la maduración del queso y pueden ejercer una notable influencia en sus propiedades organolépticas (McSweeney, 2004). Con el fin de mantener una calidad sensorial adecuada, las bacterias probióticas no deben afectar negativamente a la composición, textura, sabor y aceptación final del queso desarrollado. La adición de los probióticos

L. salivarius CECT5713 y *L. salivarius* PS2 no provocó ningún cambio sustancial en la composición del queso fresco.

El contenido de humedad de los quesos elaborados con los lactobacilos fue ligeramente superior al control (pero no estadísticamente significativo) a pesar de que los valores de a_w fueron similares. Estas diferencias pueden estar relacionadas, al menos en parte, a varios factores durante la fabricación del queso que ejercen una gran influencia en la retención de humedad en la cuajada, como la intensidad de corte, el tamaño final de los granos de la cuajada o su manipulación (Everard *et al.*, 2008). Por otra parte, existen BAL productoras de exopolisacáridos (EPS) que se emplean para aumentar la retención de humedad en el queso (Perri *et al.*, 1997; Low *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2012). Este hecho podría mejorar la textura de quesos bajos en grasa, que de otro modo tienden a ser duros y correosos. Se han descrito dos grupos de genes para la biosíntesis de EPS en algunas cepas de *L. salivarius* aunque no se ha encontrado correlación entre su presencia y el nivel de producción de EPS, una característica que depende, además, de los hidratos de carbono disponibles y de la cepa (Raftis *et al.*, 2011). Sin embargo, en la actualidad se desconoce si *L. salivarius* CECT 5713 y *L. salivarius* PS2 producen EPS. Por otra parte, se ha descrito que la microbiota del queso y su actividad metabólica pueden confundir el efecto de la humedad en a_w (Hickey *et al.*, 2013). Los cambios en el tipo y la concentración de compuestos solubles de bajo peso molecular solubles, tales como un aumento de lactato, ácidos grasos libres, aminoácidos e, incluso, péptidos muy pequeños, podrían disminuir el valor de a_w , aunque este efecto suele ser más intenso en los quesos curados (Hickey *et al.*, 2013; Saurel *et al.*, 2004).

Entre los parámetros de textura analizados en esta Tesis, sólo se detectaron diferencias en la dureza, que fue mayor en los quesos que contenían *L. salivarius* CECT 5713 que en los quesos control y en los fabricados con *L. salivarius* PS2. Sin embargo, estas diferencias no fueron percibidas por los jueces durante la prueba descriptiva, lo que indica que no tuvo un impacto relevante en la calidad sensorial y aceptación del queso. Por el contrario, los jueces indicaron que los quesos elaborados con los lactobacilos probióticos tenían una adhesividad menor que los quesos controles, a pesar de que el análisis del perfil de textura no reveló una diferencia estadísticamente significativa en este parámetro. La reducción de la adhesividad de los quesos elaborados con un cultivo de *S. thermophilus* productor de EPS se ha relacionado con la producción y liberación de EPS (Souza *et al.*, 2008, Ahmed *et al.*, 2005). Además, los jueces percibieron mayor cremosidad en el queso control que en los fabricados con *L. salivarius* CECT5713 y *L. salivarius* PS2. La cremosidad se relaciona a menudo con un alto nivel de grasa y la presencia de glóbulos de grasa, lo que se correlacionaría con un contenido de grasa ligeramente mayor en el queso control. Sin embargo, aunque el contenido de grasa del queso control fue ligeramente superior al de los quesos con probióticos, la discriminación sensorial de los niveles de grasa en los alimentos sólidos no es fácil (Frøst y Janhøj, 2007). En cuanto al color y la

textura se encontraron ligeras diferencias, aunque no fueron estadísticamente significativas; estas diferencias no fueron percibidas por los catadores entrenados lo que indica que la presencia de las cepas probióticas no afecta estos atributos distintivos del queso fresco.

El sabor a queso es el resultado de la mezcla apropiada y equilibrada de los diversos compuestos sápidos producidos a partir de proteínas, lípidos y lactosa, a través de numerosas reacciones bioquímicas en las que intervienen enzimas de la leche, cuajo, cultivos iniciadores y microbiota secundaria e, incluso, reacciones espontáneas (Smit *et al.*, 2005). Los compuestos volátiles de los quesos elaborados con las dos cepas de *L. salivarius* no fueron cualitativamente diferentes a los producidos en el queso control, observándose únicamente diferencias cuantitativas. La principal diferencia fue la mayor concentración de ácido acético en los quesos que contenían *L. salivarius* CECT5713 y *L. salivarius* PS2, probablemente en relación con una mayor degradación de la lactosa durante el almacenamiento del queso; este hecho explicaría un pH final inferior en el queso probiótico. Sin embargo, estas diferencias no afectaron a la percepción sensorial de los jueces o a la aceptación global de los quesos fabricados con *L. salivarius* CECT5713 y *L. salivarius* PS2, como se ha descrito con otras cepas probióticas (Ong *et al.*, 2006; Butiri *et al.*, 2005; Butiri *et al.*, 2005b, Souza *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2005; Souza y Saad, 2009).

IX.5 Potencial de *E. faecium* LJx4, una cepa aislada de leche humana, para la industria láctea

Los enterococos desempeñan un papel vital en la fabricación de diversos productos fermentados tales como quesos, encurtidos o productos cárnicos madurados. Muchas de las características organolépticas de dichos productos son el resultado del crecimiento y metabolismo de estas bacterias (Franz *et al.*, 2003; Franz *et al.*, 2011). La industria láctea en la actualidad controla fuertemente el proceso de fermentación y como resultado se suelen obtener productos uniformes que se describen a menudo como poco atractivos y con características organolépticas poco pronunciadas. En este contexto, sería deseable encontrar nuevas cepas para aumentar la biodiversidad, así como para diversificar y desarrollar características deseables y/o distintas en los alimentos fermentados (Cogan *et al.*, 2007; Foulquié Moreno *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 2011; Peláez y Requena, 2005).

Un estudio anterior sobre la caracterización microbiológica de la leche humana de mujeres sanas mostró que *E. faecium* era una de las especies predominantes (Martín *et al.*, 2003). Además, la caracterización de siete cepas aisladas durante ese estudio demostró que carecían de rasgos genéticos y fenotípicos de relevancia clínica (Reviriego *et al.*, 2005). La presencia en cepas de enterococos de diversas propiedades deseables, incluyendo la producción de bacteriocinas, hace haya aumentado el interés

por estos microorganismos (Foulquié Moreno *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 2011). En esta Tesis, se evaluaron diferentes propiedades de *E. faecium* LJx4 para determinar su utilidad en la fabricación de productos lácteos fermentados.

E. faecium LJx4 mostró una baja actividad acidificante aunque se obtuvieron resultados similares con otras cepas de enterococos y de lactococos de origen alimentario que se analizaron con el mismo ensayo. Este comportamiento es frecuente entre BAL que no son utilizadas como cultivos iniciadores lácteos, como es el caso de la gran mayoría de enterococos y lactococos aislados de quesos artesanales (Alonso-Calleja *et al.*, 2002; Ayad *et al.*, 2000; Sarantinopoulos *et al.*, 2001).

En los cultivos iniciadores la actividad proteolítica es muy deseable para el rápido crecimiento bacteriano en la leche, además de contribuir a la textura y al sabor del queso (Sousa *et al.* 2001). *E. faecium* LJx4 no mostró una actividad proteolítica destacable en leche, tal y como suele suceder entre los microorganismos de este género a pesar de que puede existir una cierta variabilidad entre cepas (Andrighetto *et al.*, 2001; Psoni *et al.*, 2006).

La acidificación lenta y la baja actividad proteolítica de *E. faecium* LJx4 sugieren que no sería una cepa adecuada para su aplicación como cultivo iniciador. Sin embargo, existe un creciente interés en la búsqueda y selección de cepas para mejorar el sabor de los quesos como resultado de la degradación enzimática de la proteína y la grasa de la leche. Precisamente, los enterococos juegan un papel clave en la maduración y el desarrollo del sabor en muchos quesos del sur de Europa (Franz *et al.*, 2003; Foulquié Moreno *et al.*, 2006). *E. faecium* LJx4 exhibió actividad peptidasa con los sustratos Ala-, Leu-, Lys- y Glu-pNA, revelando la presencia de, al menos, una aminopeptidasa. Sin embargo, su actividad peptidasa fue baja en comparación con la de otras BAL analizadas en esta Tesis, lo cual está en concordancia con los resultados de estudios anteriores sobre enterococos aislados de productos lácteos (Arizcun *et al.*, 1997; Psoni *et al.*, 2006; Tsakalidou *et al.*, 1994). La cepa *L. helveticus* CNRZ32 se utiliza comercialmente como cultivo adjunto para reducir el amargor en el queso y su sistema proteolítico se ha caracterizado en detalle (Christensen *et al.*, 1999). Su actividad aminopeptidasa fue muy alta con todos los sustratos ensayados, excepto con Glu-pNA. En contraste, la actividad aminopeptidasa más relevante de *E. faecium* LJx4 se detectó precisamente en este sustrato. Las BAL pueden metabolizar el ácido glutámico a través de varias rutas y así aumentar la producción de compuestos de potente sabor, tales como el ácido isoaléico, que contribuyen al sabor del queso (Kieronczyk *et al.*, 2003; Sousa *et al.*, 2001; Urbach, 1997). Es de destacar que los enterococos no hidrolizaron Pro-pNA o Glu-Pro-pNA, a excepción de *E. durans* AZ6. Las aminopeptidasas generales de las BAL no son activas en los enlaces peptídicos de prolina, que requieren prolidasas. Los péptidos que contienen prolina son amargos y su hidrólisis mejora sustancialmente el sabor del queso (Park *et al.*, 1995).

La lipólisis es otro fenómeno bioquímico importante durante la maduración del queso. Los AGCC liberados inciden directamente en el sabor del queso y, además, son precursores de compuestos aromáticos mucho más potentes como metil cetonas, lactonas, ésteres, alcoholes secundarios y aldehídos (Molimard y Spinnler, 1996). Por otra parte, las esterasas de las BAL catalizan la síntesis de ésteres en sistemas acuosos aunque se desconoce si tienen esa actividad en el queso (Fenster *et al.*, 2003; Holland *et al.*, 2005). Los ácidos butírico y propiónico fueron los sustratos preferidos para las esterasas de los enterococos y su actividad fue mayor a la de las cepas de lactococos o *L. helveticus* CNRZ32; estos resultados son similares a los descritos en estudios previos (Abeijón *et al.*, 2006; Katz *et al.*, 2007; Oliszewski *et al.*, 2007; Tsakalidou *et al.*, 1994). El perfil de las esterasas obtenidas a partir de extractos libres de células de *E. faecium* LJx4 y de otras cepas de enterococos, lactococos y *L. helveticus* CNRZ32 mostró la presencia de distintas enzimas con actividad esterásica. Sin embargo, esto es habitual en las bacterias, habiéndose utilizado como herramienta taxonómica o como marcador en estudios epidemiológicos. (Goullet y Picard, 1995; Ouzari *et al.*, 2006).

Los compuestos volátiles más abundantes detectados en los quesos experimentales elaborados fueron alcoholes, cetonas, ácidos carboxílicos y ácidos grasos. El impacto exacto de cada uno de ellos en la percepción del sabor del producto no sólo depende de la concentración en la que se encuentren y de su umbral de detección sino, también, de las posibles interacciones con otros componentes del queso (Smit *et al.*, 2005). El aislamiento de cepas bacterianas de nichos naturales y su combinación con cepas industriales se considera una posibilidad interesante para el desarrollo de nuevos cultivos que aporten compuestos y/o perfiles de sabores inusuales (Ayad *et al.*, 1999; Smit *et al.*, 2005). En este sentido, los quesos fabricados con *E. faecium* LJx4 no presentaron una alta concentración de 3-metil-1-butanol, en contraste con los elaborados con *L. lactis* ESI 153. Esta sustancia cuando está presente en cantidades relativamente grandes en los quesos proporciona aromas con notas florales y alcohólicas. Sin embargo, la concentración de acetoína y de etanol en los quesos elaborados con *E. faecium* LJx4 fue cinco y diez veces, respectivamente, la registrada en los quesos control, un hecho que podría proporcionar al queso un perfil aromático con notas alcohólicas y a mantequilla (Molimard y Spinnler, 1996).

Una característica relevante en los cultivos bacterianos utilizados en la elaboración de productos fermentados es su contribución a la seguridad microbiológica, bien por el fenómeno de exclusión competitiva microbiana y/o la producción de compuestos antimicrobianos (Stiles, 1996). Varias cepas de *E. faecium* aisladas de alimentos producen bacteriocinas que inhiben el crecimiento de patógenos asociados habitualmente a los alimentos, incluyendo *Listeria monocytogenes*. (Nes *et al.*, 2014; Favaro *et al.*, 2014). *E. faecium* LJx4 mostró actividad anti-*Listeria in vitro* aunque no se detectó capacidad bacteriocinogénica en las condiciones ensayadas. Sin embargo, esta cepa produce diez veces más etanol que *L. lactis* ESI 153 y se ha demostrado que el etanol inhibe a *L. monocytogenes* (Barker y Parque, 2001). En esta

Tesis, *L. innocua* SA1 se inoculó en la leche pasteurizada utilizada para la elaboración de leche fermentada y queso con el fin de simular una contaminación post-pasteurización. *E. faecium* LJx4 controló la población de la *L. innocua* SA1 en ambos tipos de productos aunque no de una manera tan eficiente como *L. lactis* ESI 153. En los productos elaborados con esta última cepa el recuento de lactococos fue superior y se registró en el queso una mayor cantidad de ácido acético y un pH más bajo. De forma general, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren una acción bacteriostática de *E. faecium* LJx4 frente a *L. innocua* SA1, que puede ser eficaz para el control de *Listeria* si se combina con otras barreras. De hecho, se ha demostrado un mayor efecto bacteriostático contra *L. monocytogenes* en los quesos cuando se utilizan consorcios polimicrobianos que cuando se emplea un único cultivo iniciador, aunque se desconocen qué interacciones microbianas se producen y el mecanismo exacto de la acción anti-*Listeria* (Callon *et al.*, 2014).

X. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en esta Tesis Doctoral son las siguientes:

Primera. La evaluación de las propiedades tecnológicas de una colección de 35 cepas aisladas de leche humana, y que incluía bacterias de los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium*, mostró que aquellas pertenecientes a las especies *Streptococcus salivarius* y *Enterococcus faecalis* poseían la mayor actividad acidificante. Las cepas de *Enterococcus faecalis* fueron las más proteolíticas, mientras que las de *Streptococcus salivarius* y *Lactobacillus salivarius* mostraron actividades aminopeptidásicas y esterásicas elevadas.

Segunda. Las cepas de *Lactobacillus gastricus* caracterizadas en esta Tesis Doctoral presentaron propiedades atractivas para ser empleadas en la elaboración de productos lácteos.

Tercera. La secuenciación y anotación del genoma de *Lactobacillus gastricus* PS3 confirma su potencial para su aplicación en la elaboración de productos lácteos.

Cuarta. Existe una buena correlación entre las propiedades fenotípicas relacionadas con la funcionalidad y la seguridad de *Lactobacillus fermentum* CECT5716 y la información genética contenida en su genoma.

Quinta. *Lactobacillus salivarius* CECT 5713 y *L. salivarius* PS2, dos cepas probióticas aisladas de leche humana, sobrevivieron durante la producción y el almacenamiento de quesos frescos durante 28 días a 4°C, no interfirieron con el cultivo iniciador y no modificaron significativamente la composición, las características organolépticas y la aceptación global de los quesos probióticos. En consecuencia, los quesos frescos pueden ser un buen vehículo para la administración de ambas cepas.

Sexta. *Enterococcus faecium* LJx4, una cepa segura aislada de leche humana, podría ser útil como cultivo adjunto y/o bioprotector en la industria láctea porque tiene escasa actividad acidificante y proteolítica, cambia la composición de compuestos volátiles del queso y tiene actividad anti-*Listeria* tanto *in vitro* como en dicho alimento.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Aagaard, K.,** Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., Versalovic, J. 2014. The placenta harbors a unique microbiome. *Science Translational Medicine*. 6: 237ra65-237ra65.
- Abeijón Mukdsi, M.C.,** Medina, R.B., Katz, M.B., Pivotto, R., Gatti, P., González, S.N. 2009. Contribution of lactic acid bacteria esterases to the release of fatty acids in miniature ewe's milk cheese models. *Journal of agricultural and food chemistry*. 57: 1036-1044.
- Advisory Committee on Novel Foods and Processes.** 1996. Report on *Enterococcus faecium*, strain K77D. Advisory Committee on Novel Foods and Processes report. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London, United Kingdom.
- Agerholm-Larsen, L.,** Bell, M.L., Grunwald, G.K., Astrup, A. 2000. The effect of a probiotic milk product on plasma cholesterol: a meta-analysis of short-term intervention studies. *European Journal of Clinical Nutrition*. 54: 856-860.
- Ahola, A. J.,** Knuutila-Yli, H., Suomalainen, T., Poussa, T., Ahlsrom, A., Meurman, J. H., et al. 2002. Short-term consumption of probiotic containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Archives of Oral Biology*. 47: 799-804.
- Andrighetto, C.,** Knijff, E., Lombardi, A., Torriani, S., Vancanneyt, M., Kersters, K., Swings, J., Dellaglio, F. 2001. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *Journal of Dairy Research*. 68: 303-316.
- Arbolea, S.,** Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Solís, G., Salminen, S., de Los Reyes-Gavilán, C.G., Gueimonde, M. 2011. Characterization and in vitro properties of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-milk. *International Journal of Food Microbiology*. 149: 28-36.
- Arias, C.A.,** Murray, B.E. 2012. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 10: 266-278.
- Arias, C.A.,** Murray, B.E. 2012. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 10: 266-278.
- Arribas, B.,** Rodríguez-Cabezas, M.E., Comalada, M., Bailon, E., Camuesco, D., Olivares, M., Xaus, J., Zarzuelo, A., Galvez, J. 2009. Evaluation of the preventative effects exerted by *Lactobacillus fermentum* in an experimental model of septic shock induced in mice. *British journal of nutrition*. 101: 51-58.
- Arroyo, R.,** Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Fernández, L., Rodríguez, J.M. 2010. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of lactobacilli isolated from breast milk. *Clinical Infectious Disease*. 50: 1551-1558.

- Authority, E. F. S.** 2015. ECDC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. *EFSA Journal*. 13:1.
- Axelsson, L.** 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In : "Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects". 3^a Edition. Salminen S, von Wright A, Ouwehand A.C. (eds.). Marcel Dekker Inc. New York. 1-16.
- Axelsson, L.** 2004. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. Chapter 1. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. Salminen S., von Wright, A. (eds.). 1-66.
- Ballard, O.,** Morrow, A.L. 2013. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatric Clinics of North America*. 60: 49-74.
- Beasley, S.S.,** Saris, P.E.J. 2004. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 5051-5053.
- Becquet, P.** 2003. EU assessment of enterococci as feed additives. *International Journal of Microbiology*. 88: 247-254.
- Beltrán, D.A.,** Crespo, A.E., Rodríguez, T.C., García, A. 2015. Mastitis infecciosa: nueva solución para un viejo problema. *Nutrición Hospitalaria*. 31: 89-95.
- Beresford, T.,** Williams, A. 2004. The microbiology of cheese ripening. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 1: 287-317.
- Bergamini, C.V.,** Hynes, E.R., Zalazar, C.A. 2006. Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of a semi-hard cheese. *International Dairy Journal*. 16: 856-866.
- Bergmann, H.,** Rodríguez J.M., Salminen, S., Szajewska, H. 2014. Probiotics in human milk and probiotic supplementation in infant nutrition: a workshop report. *British Journal of Nutrition*. 112:1119-28.
- Beyer, W.F., Jr** Fridovich, I. 1985. Pseudocatalase from *Lactobacillus plantarum*: evidence for a homopentameric structure containing two atoms of manganese per subunit. *Biochemistry*. 24: 6460-6467.
- Bolotin, A.,** Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarne, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Sorokin, A. 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Research*. 11: 731-753.
- Bottacini, F.,** Ventura, M., van Sinderen, D., O'Connell Motherway, M. 2014. Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. *Microbial Cell Factories*. 13: 1-S4.
- Bourgogne, A.,** Garsin, D.A., Qin, X., Singh, K.V., Sillanpaa, J., Yerrapragada, S., ... Weinstock, G.M. 2008. Large scale variation in *Enterococcus faecalis* illustrated by the genome analysis of strain OG1RF. *Genome Biology*. 9: R110.
- Broadbent, J.R.,** Cai, H., Larsen, R.L., Hughes, J.E., Welker, D.L., De

- Carvalho, V.G., Tompkins, T.A., Ardö, Y., Vogensen, F., De Lorentiis, A., Gatti, M., Neviani, E., Steele, J.L. 2011. Genetic diversity in proteolytic enzymes and amino acid metabolism among *Lactobacillus helveticus* strains. *Journal of Dairy Science*. 94: 4313-4328.
- Broome, M.C.,** Powell, I.B., Limsowtin, G.K.Y. 2002. Starter Cultures: Specific Properties. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2nd ed. Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H (eds). Academic Press, London. 269-275.
- Byappanahalli, M. N.,** Nevers, M. B., Korajkic, A., Staley, Z. R., Harwood, V. J. 2012. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76: 685-706.
- Cabrera-Rubio, R.,** Collado, M.C., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E., Mira, A. 2012. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *American Journal of Clinical Nutrition*. 96: 544-51.
- Calzada, J.,** del Olmo, A., Picón, A., Gaya, P., Nuñez, M. 2013. Reducing biogenic-amine-producing bacteria, decarboxylase activity, and biogenic amines in raw milk cheese by high-pressure treatments. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(4), 1277-1283.
- Camargo, C.H.,** Bruder-Nascimento, A., Lee, S.H.I., Júnior, A.F., Kaneno, R., Rall, V.L.M. 2014. Prevalence and phenotypic characterization of *Enterococcus* spp. isolated from food in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 45 :111-115.
- Caplice, E.,** Fitzgerald, G.F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International journal of food microbiology*. 50: 131-149.
- Casarotti, S.N.,** Monteiro, D.A., Moretti, M.M.S, Penna, A.L.B. 2014. Influence of the combination of probiotic cultures during fermentation and storage of fermented milk. *Food Research International*. 59: 67-75.
- Centeno, J.A.,** Menéndez, S., Rodríguez-Otero, J.L. 1996. Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese (Northwest Spain). *International Journal of Food Microbiology*. 33: 307-313.
- Champagne, C.P.** 2006. Starter cultures biotechnology: the production of concentrated lactic cultures in alginate beads and their applications in the nutraceutical and food industries. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*. 12: 11-17.
- Charlson, E.S.,** Bittinger, K., Haas, A.R., Fitzgerald, A.S., Frank, I., Yadav, A., Bushman, F.D, Collman, R.G. 2011. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 184: 957-963.
- Charteris, W.P.,** Kelly, P.M., Morelli, L., Collin, J.K. 1998. Development

- and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* & *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*. 84: 759-768.
- Chen, H.,** Hoover, D.G. 2006. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2: 82-100.
- Christensen, J.E.,** Dudley, E.G., Pederson, J.A., Steele, J.L. 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 76: 217-46.
- Coelho, M.C.,** Silva, C.C.G., Ribeiro, S.C., Dapkevicius, M.L.N.E., Rosa, H.J.D. 2014. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 191: 53-59.
- Connolly, E.,** Abrahamsson, T., Björkstén, B. 2005. Safety of D(-)-Lactic Acid Producing Bacteria in the Human Infant. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*. 41: 489-492.
- Crow, V.,** Curry, B., Hayes, M. 2001. The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. *International Dairy Journal*. 11: 275-283.
- da Cruz, A.G.,** Buriti, F.C.A., de Souza, C.H.B., Faria, J.A.F., Saad, S.M.I. 2009. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science & Technology*. 20: 344-354.
- Dave, R.I.,** Shah, N.P. 1997. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal*. 7: 31-41.
- Davies, F.L.,** Shankar, P.A., Brooker, B.E., Hobbs, D.G. 1978. A heat-induced change in the ultrastructure of milk and its effect on gel formation in yoghurt. *Journal of Dairy Research*. 45: 53-58.
- de Cadiñanos, L.P.G.,** García-Cayuela, T., Yvon, M., Martínez-Cuesta, M.C., Peláez, C., Requena, T. 2013. Inactivation of the panE gene in *Lactococcus lactis* enhances formation of cheese aroma compounds. *Applied and Environmental Microbiology*. 79: 3503-3506.
- De Souza, C. H.,** Buriti, F. C., Behrens, J. H., Saad, S. M. 2008. Sensory evaluation of probiotic Minas fresh cheese with *Lactobacillus acidophilus* added solely or in co-culture with a thermophilic starter culture. *International journal of food science & technology*. 43: 871-877.
- de Vos, W. M.** 2011. Systems solutions by lactic acid bacteria: from paradigms to practice. *Microbial Cell Factories*. 10: S2.1-13
- de Vries, W.,** Stouthamer, A.H. 1967. Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of bifidobacteria. *Journal of Bacteriology*. 93: 574-576.
- Devriese, L. A.,** Pot, B., Collins, M. D. (1993). Phenotypic identification of

- the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *Journal of Applied Bacteriology*. 75: 399-408.
- Dewhirst, F.E.,** Chen, T., Izard, J., Paster, B.J., Tanner, A. C. R., Yu, W-H, Lakshmanan, A., Wade, W. G. 2010. *The human oral microbiome*. *J. Bacteriol.* 192 : 5002-5017.
- Díaz-Ropero, M. P.,** Martin, R., Sierra, S., Lara-Villoslada, F., Rodriguez, J. M., Xaus, J., & Olivares, M. 2007. Two *Lactobacillus* strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response. *Journal of applied microbiology*. 102: 337-343.
- Dicks, L.M.,** Botes, M. 2010. Probiotic lactic acid bacteria in the gastrointestinal tract: health benefits, safety and mode of action. *Beneficial Microbes*. 1: 11-29.
- Dinakar, P.,** Mistry, V.V. 1994. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* . 77: 2854-2864.
- Domann, E.,** Hain, T., Ghai, R., Billion, A., Kuenne, C., Zimmermann, K., Chakraborty, T. 2007. Comparative genomic analysis for the presence of potential enterococcal virulence factors in the probiotic *Enterococcus faecalis* strain Symbioflor 1. *International Journal of Medical Microbiology* . 297: 533-539.
- Donnet-Hughes, A.,** Perez, P. F., Doré, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., ... & Schiffrin, E. J. 2010. Potential role of the intestinal microbiota of the mother in neonatal immune education. *Proceedings of the Nutrition Society*. 69: 407-415.
- Douillard, F.P.,** de Vos, W.M. 2014. Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. *Microbial Cell Factories*. 13: 1-S8.
- Douillard, F.P.,** Ribbera, A., Kant, R., Pietilä, T.E., Järvinen, H.M., Messing, M., Randazzo, C.L., Paulin, L., Laine P, Ritari J, Caggia C, Lähäinen T., Brouns, S.J, Satokari, R., von Ossowski, I., Reunanen, J., Palva, A, de Vos W.M. 2013. Comparative genomic and functional analysis of 100 *Lactobacillus rhamnosus* strains and their comparison with strain GG. *PLoS Genetics*. 9: e1003683.
- Doyle, M.P.,** Steenson, L.R., Meng, J. 2013. Bacteria in food and beverage production. Chapter 8. In *The Prokaryotes-Applied Bacteriology and Biotechnology*. Rosenberg et al. (eds.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 241-256.
- Dušková, M.,** Šedo, O., Kšicová, K., Zdráhal, Z., Karpíšková, R. 2012. Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. *International Journal of Food Microbiology* .159: 107-114.
- Duwat, P.,** Sourice, S., Cesselin, B., Lamberet, G., Vido, K., Gaudu, P., Le Loir Y., Violet, F., Loubiere P., Gruss A. 2001. Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *Journal of Bacteriology*. 183: 4509-4516.

- Eaton, T., Gasson M.J.** 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied Environmental Microbiology*. 67: 1628-1635.
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP).** 2012. Guidance on the safety assessment of *Enterococcus faecium* in animal nutrition. *EFSA Journal*. 10: 2682. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal.
- El-Hofi, M., El-Tanboly, E.S., Abd-Rabou, N.S.** 2011. Industrial Application of Lipases in Cheese Making: A review. *Internet Journal of Food Safety*. 13: 293-302.
- Esteban C.D., Pérez Martínez G.** 2007. Plásmidos y transmisión horizontal de genes. En Fundamentos Biológicos, Procesos y Biotecnología de las Bacterias Lácticas. Vol 1. G. Pérez-Martínez (ed.). Edita CSIC, Madrid. doi: 10.1017/S0022029907002981. Epub 2008 Jan 29.
- Euzéby, J.P.** 1997. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *International journal of systematic bacteriology*, 47, 590-592. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.net>; último acceso: 20 de enero de 2015).
- FAO Statistical Year book** .2012. Europe and Central Asia Food and Agriculture, Part I FAO 2013, www.FAO.Org
- FAO.** 2004. Report on the Sixth Session of the Codex Committee on Milk and Milk Products. <http://www.fao.org/docrep/meeting/008/j2366e/j2366e06.htm>. Auckland, New Zealand: Food and Agricultural Organization of the United Nations.
- FAO.** 2013. Milk and dairy products in human nutrition. 2013. Muehlhoff E, Bennett A, McMahon D (eds.). Rome.
- FAO/WHO,** “Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria,” Technical Report, FAO/WHO, Geneva, Switzerland, 2001.
- Favaro, L., Basaglia, M., Casella, S., Hue, I., Dousset, X., Gombossy de Melo Franco, B.D., Todorov, S.D.** 2014. Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from home made white brine cheese. *Food Microbiology*. 38: 228-239.
- Fellis, G.E., Dellaglio, F.** 2007. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. 8: 44-61.
- Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R., Rodríguez, J.M.** (2013). The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease.

- Pharmacological Research*. 69: 1-10.
- Fernández, M.**, Hudson, J. A., Korpela, R., de los Reyes-Gavilán, C.G. 2015. Impact on Human Health of Microorganisms Present in Fermented Dairy Products: An Overview. *BioMed Research International*. 2015: 412714
- Fernández, M.**, van Doesburg, W., Rutten, G.A., Marugg, J.D., Alting, A.C., van Kranenburg, R., & Kuipers, O.P. 2000. Molecular and Functional Analyses of the metC Gene of *Lactococcus lactis*, Encoding Cystathionine β -Lyase. *Applied and environmental microbiology*, 66: 42-48.
- Florez, A.B., Mayo, B. 2006. Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *International Journal of Food Microbiology*. 110: 165-171.
- Forssten, S.D.**, Sindelar, C.W, Ouwehand, A.C. 2011. Probiotics from an industrial perspective. *Anaerobe*. 17: 410-413.
- Foulquié Moreno, M.R.**, Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., de Vuyst, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. 106: 1-24.
- Fox, P.F.** 1989. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*. 72: 1379-1400.
- Fox, P.F.** 2011b. Cheese: Overview. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2nd edition. Fuquay, J.W., Fox P.F., McSweeney P.L.H (eds.). Elsevier Science and Technology, Oxford.
- Fox, P.F.**, Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H. 2000. In *Fundamentals of cheese science*. Aspen Publishers, Maryland, USA.(Faltan el vol y las págs)
- Fox, P.F.**, Lucy, J.A., Cogan, T.M. 1990. Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 29: 237-253
- Fox, P.F.**, McSweeney, P.L.H. 1996. Proteolysis in cheese during ripening. *Food Reviews International*. 12: 457-509.
- Fox, P.F.**, McSweeney, P.L.H. 2004. Cheeses: an overview. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (eds.). Academic Press. 1: 287-317.
- Franz, C. M.**, Stiles, M. E., Schleifer, K. H., Holzapfel, W. H. (2003). Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *International Journal of Food microbiology*. 88: 105-122.
- Franz, C.M.**, Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., Gálvez, A. 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 151: 125-140.
- Franz, C.M.**, Van Belkum, M. J., Holzapfel, W.H., Abriouel, H., Gálvez, A. 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a

- new classification scheme. *FEMS Microbiology Reviews*. 31: 293-310.
- Franz, C.M.A.P.,** Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M.K, Vancanneyt, M., Swings, J., Holzapfel W.H. 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Applied Environmental Microbiology*. 67:4385-4389.
- Franz, C.M.A.P.,** Specht, I., Haberer, P., Holzapfel, W.H. 2001a. Bile salt hydrolase activity of enterococci isolated from food: screening and quantitative determination. *Journal of Food Protection*. 64: 725-729.
- Funkhouser, L.J.,** Bordenstein, S.R. 2013. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. *PLoS Biology*. 11: e1001631
- Fuquay, J.W.,** Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. 2011. *Encyclopedia of Dairy Sciences* 2nd Edition, Four-Volume set. Academic Press.
- Galesloot, T.E.,** Hassing, F., Veringa, H.A., Davelaar, H. 1968. Symbiosis in yoghurt. *NIZO-Verslagen*. 111-112
- Gálvez, A.,** Abriouel, H., Benomar, N., Lucas, R. 2010. Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. *Current opinion in biotechnology*. 21: 142-148.
- García-Cayuela, T.,** de Cadiñanos, L.P.G., Peláez, C., Requena, T. 2012. Expression in *Lactococcus lactis* of functional genes related to amino acid catabolism and cheese aroma formation is influenced by branched chain amino acids. *International Journal of Food Microbiology*. 159: 207-213.
- García-Quintáns, N.,** Repizo, G., Martín, M., Magni, C., López, P. 2008. Activation of the diacetyl/acetoin pathway in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* CRL264 by acidic growth. *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 1988-1996.
- Gardiner, G.E.,** Ross, R.P., Wallace, J.M., Scanlan, F.P., Jägers, P.P.J.M., Fitzgerald, G.F., Collins, J.K., Stanton, C. 1999. Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of Cheddar cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 4907-4916.
- Gil-Campos, M.,** López, M.Á., Rodríguez-Benítez, M.V., Romero, J., Roncero, I., Linares, M.D., Maldonado, J., López-Huertas, E., Berwind, R., Ritzenthaler, K.L., Navas, V., Sierra, C., Sempere, L., Geerlings, A., Maldonado-Lobón, J.A., Valero, A.D., Lara-Villoslada, F., Olivares, M. 2012. *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 is safe and well tolerated in infants of 1-6 months of age: a randomized controlled trial. *Pharmacological Research*. 65: 231-238.
- Gilliland, S.E.** 2001. Technological and Commercial Applications of Lactic Acid Bacteria; Health and Nutritional Benefits. *Dairy Products* (<ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/Gilli.pdf>) [Último acceso: 10 febrero 2015].
- Gilmore, M.S.,** Lebreton, F., van Schaik, W. 2013. Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital

- infection in the antibiotic era. *Current Opinion in Microbiology* . 16 :10-16.
- Giraffa, G.** (2002). Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*. 26: 163-171.
- Giraffa, G.,** Chanishvili, N., Widyastuti, Y. 2010. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology*. 161: 480-487.
- Gobbetti, M.,** Fox, P.F., Stepaniak, L. 1997. Isolation and characterization of a tributyrin esterase from *Lactobacillus plantarum* 2739. *Journal of Dairy Science*. 80: 3099-3106.
- Gomes, A. A.,** Braga, S. P., Cruz, A. G., Cadena, R. S., Lollo, P. C. B., Carvalho, C., ... and Bolini, H.M.A. 2011. Effect of the inoculation level of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic cheese on the physicochemical features and sensory performance compared with commercial cheeses. *Journal of Dairy Science*. 94: 4777-4786.
- Gomes, A.M.P.,** Malcata, F. X., Klaver, F.A.M., Grande, H. J. 1995. Incorporation and survival of *Bifidobacterium* sp. Strain Bo and *Lactobacillus acidophilus* strain Ki in a cheese product. *Netherlands milk and dairy journal*. 49: 71-95
- Gomes, A.M.P.,** Malcata, F.X. 1998. Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. *Journal of Dairy Science*. 81: 1492-1507
- Grande Burgos, M. J.,** Pulido, R. P., del Carmen López Aguayo, M., Gálvez, A., Lucas, R. (2014). The Cyclic Antibacterial Peptide Enterocin AS-48: Isolation, Mode of Action, and Possible Food Applications. *International journal of molecular sciences*. 15: 22706-22727.
- Grönlund, M.M.,** Gueimonde, M., Laitinen, K., Kociubinski, G., Grönroos, T., Salminen, S., Isolauri, E. 2007. Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the *Bifidobacterium* microbiota in infants at risk of allergic disease. *Clinical & Experimental Allergy*. 37: 1764-72.
- Guinee, T.P.** 2004. Salting and the role of salt in cheese. *International Journal of Dairy Technology*. 57: 99-109.
- Guizani, N.,** Mothershaw, A. 2007. Fermentation as a method for food preservation. In *Handbook of Food Preservation*. 2nd ed. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, USA. Pp. 215-236.
- Hammes, W.P.,** Hertel, C. 2006. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In *The prokaryotes*. Dworkin et al. (eds.). Springer US. 320-403.
- Hassan, A.N.,** Frank, J.F., 2001. Starter cultures and their use. In *Applied Dairy Microbiology*, 2nd edition. , E.H. Marth and J.L. Steele (eds). Marcel Dekker, Inc, New York. 151-206
- Hassiotou, F.,** Geddes, D.T., Hartmann, P.E. 2013. Cells in human milk: state of the science. *Journal of Human Lactation*. 29:171-82.

- Hayes, M.,** Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. 2007. Putting microbes to work: dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: bioactive peptide functions. *Biotechnology Journal*. 2:435-449.
- Heikkilä, M.P.** Saris, P.E.J. 2003. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *Journal of Applied Microbiology*. 95: 471-478.
- Herbel, R.H,** Vahjen, W., Wieler, L.H. 2013. Timely approaches to identify probiotic species of the genus *Lactobacillus*. *Gut Pathogens*. 5:27.
- Herrera, E. A.C.** Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estarter para la industria láctea y cárnica. Conferencia dada en: Simposio Regional de Microbiología “Microorganismos Eficientes en el Sector Productivo”, Universidad Libre, Barranquilla, Colombia. 15 y 16 de septiembre de 2006.
- Hill, A.R.,** Kethireddipalli, P. 2013. Dairy Products: Cheese and Yogurt. Part II. Chapter 8. In *Biochemistry of Foods*. Eskin N.M, Shahidi, F. (eds.). Academic Press. 319-362
- Hlivak, P.,** Odraska, J., Ferencik, M., Ebringer, L., Jahnova, E., Mikes, Z., 2005. One-year application of probiotic strain *Enterococcus faecium* M-74 decreases serum cholesterol levels. *Bratislavské Lekárske Listy*. 106: 67-72.
- Høier, E.,** Janzen, T., Rattray, F., Sørensen, K., Børsting, M.W., Brockmann, E., Johansen, E. 2010. The production, application and action of lactic cheese starter cultures. In *Technology of Cheesemaking*. Law, B.A. and Tamime, A.Y. (eds). Wiley, Blackwell Publishing Ltd. 166-192.
- Holland, R.,** Coolbear, T. 1996. Purification of tributyrin esterase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* E8. *Journal of Dairy Research*. 63: 131-40.
- Holland, R.,** Liu, S.Q., Crow, V.L., Delabre, M.L., Lubbers, M., Bennett, M., Norris, G. 2005. Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: Milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. *International Dairy Journal*. 15: 711-718.
- Holzappel, W.H.,** Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73: 365s-373s.
- Hughenoltz, J.** 1993. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 12: 165-178.
- Hunt, K.M.,** Foster, J.A., Forney, L.J., Schütte, U.M.E., Beck, D.L., Abdo, Z., Fox, L.K., Williams, J.E., McGuire, M.K., McGuire, M.A. 2011. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS ONE*. 6: e21313.
- Hunt, K.M.,** Preuss, J., Nissan, C., Davlin, C.A, Williams, J.E., Shafii, B., Richardson, A.D, McGuire, M.K., Bode, L., McGuire, M.A. 2012. Human milk oligosaccharides promote the growth of

- staphylococci. *Applied and Environmental Microbiology*. 78: 4763-4770.
- Huycke, M.M.,** Moore, D., Joyce, W., Wise, P., Shepard, L., Kotake, Y., Gilmore, M. S. 2001. Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* requires demethylmenaquinone and is attenuated by functional terminal quinol oxidases. *Molecular microbiology*, 42: 729-740.
- International Dairy Federation.** 2005. The world market for cheese .1995-2004. *Bulletin IDF*. 402: 5-18.
- Ishibashi, N.,** Shimamura, S. 1993. Bifidobacteria: research and development in Japan. *Food Technology*. 47: 126-135
- Jaeger, K-E.,** Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., van Heuvel, M., Misset, O. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*. 15: 29-63.
- Jeurink, P.V.,** van Bergenhenegouwen, J., Jiménez, E., Knippels, L.M., Fernández, L., Garssen, J., Knol, J., Rodríguez, J.M., Martín, R. 2013. Human milk: a source of more life than we imagine. *Beneficial Microbes*. 4: 17-30.
- Jiménez, E.,** Delgado, S., Fernández, L., García, N., Albújar, M., Gómez, A., Rodríguez, J.M. 2008a. Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of staphylococcal and enterococcal populations for potential virulence factors. *Research in Microbiology*. 159: 595-601.
- Jiménez, E.,** Delgado, S., Maldonado, A., Arroyo, R., Albújar, M., García, N., Jarrod, M., Fernández, L., Gómez, A., Rodríguez, J.M. 2008b. *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC Microbiology*. 8:143.
- Jiménez, E.,** Fernández, L., Maldonado, A., Martín, R., Olivares, M., Xaus, J., Rodríguez, J. M. 2008. Oral administration of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Applied and environmental microbiology*. 74: 4650-4655.
- Jiménez, E.,** Fernández, L., Marín, M.L., Martín, R., Odriozola, J.M., Nueno-Palop, C., Narbad, A., Olivares, M., Xaus, J., Rodríguez, J.M. 2005. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Current Microbiology*. 51: 270-4.
- Jiménez, E.,** Langa, S., Martín, V., Arroyo, R., Martín, R., Fernández, L., Rodríguez J.M. 2010a. Complete genome sequence of *Lactobacillus fermentum* CECT 5716, a probiotic strain isolated from human milk. *Journal of Bacteriology*. 192: 4800-4800.
- Jiménez, E.,** Martín, R., Maldonado, A., Martín, V., Gómez de Segura, A., Fernández, L., Rodríguez, J.M. 2010b. Complete genome sequence of *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a probiotic strain isolated from human milk and infant feces. *Journal of Bacteriology*. 192: 5266-5267.

- Jiménez, E.,** Villar-Tajadura, M.A., Marín, M., Fontecha, J., Requena, T., Arroyo, R., Fernández, L., Rodríguez, J.M. 2012. Complete genome sequence of *Bifidobacterium breve* CECT 7263, a strain isolated from human milk. *Journal of Bacteriology*. 194: 3762-3763.
- Jin, L.,** Hinde, K., Tao, L. 2011. Species diversity and relative abundance of lactic acid bacteria in the milk of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Journal of Medical Primatology*. 40(1):52-58.
- John, R.P.,** Nampoothiri, K.M., Pandey, A. 2007. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74: 524-534.
- Johnson, M.E.,** Riesterer, B.A., Olson N.F. 1990. Influence of nonstarter bacteria on calcium lactate crystallization on the surface of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 73:1145-1149.
- Johnson, M.E.,** Steele, J.L. 2013. Fermented dairy products. In *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, 4th ed. Doyle, M.P., Buchanan, R.L. ASM Press, Washington, DC. 825-839.
- Jost, T.,** Lacroix, C., Braegger, C. Chassard, C. 2013. Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *The British Journal of Nutrition*. 110: 1253-1262.
- Juillard, V.,** Laan, H., Kunji, E., Jeronimus-Stratingh, C.M., Bruins, A., Konings, W. 1995a. The extracellular PI-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes β -casein into more than one hundred different oligopeptides. *Journal of Bacteriology*. 177: 3472-3478.
- Juillard, V.,** Le Bars, D., Kunji, E.R., Konings, W.N., Gripon, J.C., Richard, J. 1995b. Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 3024-3030.
- Karimi, R.,** Mortazavian, A.M., Da Cruz, A.G. 2011. Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. *Dairy Science & Technology*. 91: 283-308.
- Kayser, F.H.** 2003. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *International Journal of Food Microbiology*. 88: 255-262.
- Kennell, J.,** McGrath, S. 2005. Starting the process of mother-infant bonding. *Acta Paediatrica*. 94: 775-7.
- Khalid, K.** 2011. An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*. 1: 1-13.
- Kim, E.B.,** Marco, M.L. 2014. Nonclinical and clinical *enterococcus faecium* strains, but not *Enterococcus faecalis* strains, have distinct structural and functional genomic features. *Applied and Environmental Microbiology*. 80: 154-165.
- Kleerebezem, M.,** Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D.,

- Kuipers, O.P., Leer, R., Tarchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M.W.E.J. et al: 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100: 1990-1995.
- Kleerebezem, M.**, Hols, P., Bernard, E., Rolain, T., Zhou, M., Siezen, R.J., Bron, P.A. 2010. The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiol Rev*. 34: 199-230.
- Köll-Klais, P.**, Mändar, R., Leibur, E., Marcotte, H., Hammarström, L., Mikelsaar, M. 2005. Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. *Oral Microbiology and Immunology*. 20: 354-361.
- Kosikowski, F.**, Vikram, V.M. 1977. *Cheese and fermented milk foods*. 168.
- Kostic, A.D.**, Howitt, M.R., Garrett, W.S. 2013. Exploring host-microbiota interactions in animal models and humans. *Genes & Development*. 27: 701-718.
- Kristich, C.J.**, Rice, L.B., Arias, C.A. 2014. Enterococcal infection: treatment and antibiotic resistance. En: *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y., Shankar, N. (eds)
- Ladero, V.**, Fernández, M., Cuesta, I., Alvarez, M.A. 2010. Quantitative detection and identification of tyramine-producing enterococci and lactobacilli in cheese by multiplex qPCR. *Food Microbiology*. 27: 933-939.
- Lahtinen, S.J.** 2012. Probiotic viability - does it matter? *Microbial Ecology in Health & Disease*. 23: 18567.
- Lamont, R.F.**, Sobel, J.D., Akins, R. A., Hassan, S.S., Chaiworapongsa, T., Kusanovic, J. P., Romero, R. 2011. The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 118: 533-549.
- Lamont, R.F.**, Sobel, J.D., Akins, R.A., Hassan, S.S., Chaiworapongsa, T., Kusanovic, J.P., Romero, R. 2011. The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 118: 533-549.
- Lanfermeijer, F.C.**, Picon, A., Konings, W.N., Poolman, B. 1999. Kinetics and consequences of binding of nona- and dodecapeptides to the oligopeptide binding protein (OppA) of *Lactococcus lactis*. *Biochemistry*. 38: 14440-14450.
- Langa, S.**, Maldonado-Barragán, A., Delgado, S., Martín, R., Martín, V., Jiménez, E., Ruíz-Barba, J.L., Mayo, B., Connor, R.I., Suárez, J.E., Rodríguez, J.M. 2012. Characterization of *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a strain isolated from human milk: from genotype to phenotype. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 94: 1279-1287.
- Lavasini, S.A.**, Reza, M.R., Ehasani, S., Mirdamadi, E.Z., Mousavi, Ali, M.

2012. Changes in physicochemical and organoleptic properties of traditional Iranian cheese Lighvan during ripening. *International Journal of Dairy Technology*. 65: 64-70.
- Lawrence, R.C.,** Creamer, L.K., Gilles, J. 1987. Texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 70: 1748-1760.
- Lawrence, R.C.,** Pearce, L.E. 1972. Starter culture under control. *Dairy Industries International*. 37: 73-78.
- Lebreton, F.,** Willems, R.J.L., Gilmore, M.S. 2014. *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. In: *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y., Shankar, N. (eds). [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190427>].
- Lechardeur, D.,** Cesselin, B., Fernandez, A., Lamberet, G., Garrigues, Ch., Pedersen, M., Gaudu, P., Gruss, A. 2010. Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. 22: 1-7.
- Lee, J.H., Diono, R., Kim, G.Y., Min, D.B. 2003. Optimization of solid phase microextraction analysis for the headspace volatile compounds of Parmesan cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 1136-1140.
- Leroy, F.,** de Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*. 15: 67-78.
- Linares, D.M.,** del Río, B., Ladero, V., Martínez, N., Fernández, M., Martín, M. C., Álvarez, M. A. 2012. Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Frontiers in Microbiology*. 3:180.
- Linares, D.M.,** Martín, M., Ladero, V., Álvarez, M. A., Fernández, M. 2011. Biogenic amines in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 51: 691-703.
- Liu, M.,** Bayjanov, J.R., Renckens, B., Nauta, A., Siezen, R.J. 2010. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genomics*. 11: 36.
- Liu, S.N.,** Han, Y., & Zhou, Z. J. 2011. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Research International*. 44: 643-651.
- Lopez, M.,** Saenz, Y., Rojo-Bezares, B., Martinez, S., del Campo, R., Ruiz-Larrea, F., Zarazaga, M., Torres, C., 2009. Detection of vanA and vanB2-containing enterococci from food samples in Spain, including *Enterococcus faecium* strains of CC17 and the new singleton ST425. *International Journal of Food Microbiology*. 133: 172-178.
- Ludwig, W.,** Klenk, H.P. 2001. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. In *Bergey's manual® of systematic bacteriology*. Springer New York. 49-65.
- Lynch, K.M.,** McSweeney, P.L.H., Arendt, E.K., Uniacke-Lowe, T., Galle, S., Coffey, A. 2014. Isolation and characterisation of exopolysaccharide-producing

- Weissella* and *Lactobacillus* and their application as adjunct cultures in Cheddar cheese. *International Dairy Journal*. 34: 125-134.
- Makarova, K.**, Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., ... & Mills, D. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103: 15611-15616.
- Makino, H.**, Kushiro, A., Ishikawa, E., Muylaert, D., Kubota, H., Sakai, T., Oishi, K., Martín, R., Ben Amor, K., Oozeer R, Knol J, Tanaka R. 2011. Transmission of intestinal *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strains from mother to infant, determined by multilocus sequencing typing and amplified fragment length polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*. 77: 6788-6793.
- Maldonado, J.**, Cañabate, F., Sempere, L., Vela, F., Sánchez, A.R., Narbona, E., López-Huertas, E., Geerlings, A., Valero, A.D., Olivares, M., Lara-Villoslada, F. 2012. Human milk probiotic *Lactobacillus fermentum* CECT5716 reduces the incidence of gastrointestinal and upper respiratory tract infections in infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 54: 55-61.
- Maldonado-Lobón, J.A.**, Gil-Campos, M., Maldonado, J., López-Huertas, E., Flores-Rojas, K., Valero, A.D., Rodríguez-Benítez, M.V., Bañuelos. O., Lara-Villoslada, F., Fonollá J, Olivares M. 2015 (en prensa). Long-term safety of early consumption of *Lactobacillus fermentum* CECT5716: A 3-year follow-up of a randomized controlled trial. *Pharmacological Research*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2015.01.006>
- Mañé J.**, Lorén V, Pedrosa E, Ojanguren I, Xaus J, Cabré E, Domènech E, Gassull MA. 2009. *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 prevents and reverts intestinal damage on TNBS-induced colitis in mice. *Inflammatory Bowel Diseases*. 15(8):1155-63.
- Maragkoudakis, P.A.**, Miaris, C., Rojez, P., Manalis, N., Magkanari, F., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. 2006. Production of traditional Greek yoghurt using *Lactobacillus* strains with probiotic potential as starter adjuncts. *International Dairy Journal*. 16: 52-60.
- Marín, M.L.**, Arroyo, R., Jiménez, E., Gómez, A., Fernández, L. Rodríguez, J.M. 2009. Cold storage of human milk: Effect on its bacterial composition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 49: 343-348.
- Martín, R.**, Delgado, S., Maldonado, A., Jiménez, E., Olivares, M., Fernández, L., Sobrino, O.J., Rodríguez, J.M. 2009. Isolation of lactobacilli from sow milk and evaluation of their probiotic potential. *Journal of Dairy Research*. 76: 418-25.
- Martín, R.**, Heilig, H.G., Zoetendal, E.G., Jiménez, E., Fernández, L., Smidt, H., Rodríguez, J.M. 2007. Cultivation-independent assessment

- of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Research in Microbiology*. 158: 31-7.
- Martín, R.,** Jiménez, E., Heilig, H., Fernández, L., Marín, M. L., Zoetendal, E. G., Rodríguez, J. M. 2009. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 965-969.
- Martín, R.,** Jiménez, E., Olivares, M., Marín, M.L., Fernández, L., Xaus, J., Rodríguez, J.M. 2006. *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. *International Journal of Food Microbiology*. 112: 35-43.
- Martín, R.,** Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M.L., Olivares, M., Boza, J., Jiménez, J., Fernández, L., Xaus, J. Rodríguez, J.M., The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends in Food Science & Technology*. 2004. 15: 121-127.
- Martín, R.,** Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M. L., Xaus, J., ... & Rodríguez, J.M. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of Pediatrics*, 143: 754-758.
- Martín, R.,** Olivares, M., Marín, M.L., Fernández, L., Xaus, J., Rodríguez, J.M. 2005. Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. *Journal of Human Lactation*. 21: 8-17.
- Martín, R.,** Olivares, M., Pérez, M., Xaus, J., Torre, C., Fernández, L., Rodríguez, J.M. 2010. Identification and evaluation of the probiotic potential of lactobacilli isolated from canine milk. *The Veterinary Journal*. 185: 193-198.
- Martín, V.,** Maldonado-Barragán, A., Jiménez, E., Ruas-Madiedo, P., Fernández, L., Rodríguez, J.M. 2012. Complete genome sequence of *Streptococcus salivarius* PS4, a strain isolated from human milk. *Journal of Bacteriology*. 194: 4466-4467.
- Martín, V.,** Maldonado-Barragán, A., Moles, L., Rodríguez-Baños, M., Campo, R.D., Fernández, L., Rodríguez, J.M., Jiménez, E. 2012. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *Journal of Human Lactation*. 28: 36-44.
- Martín, V.,** Mañes-Lázaro, R., Rodríguez, J.M., Maldonado-Barragán, A. 2011. *Streptococcus lactarius* sp. nov., isolated from breast milk of healthy women. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61: 1048-1052.
- Martínez-Cuesta, M.D.C.,** Peláez, C., Requena, T. 2013. Methionine metabolism: major pathways and enzymes involved and strategies for control and diversification of volatile sulfur compounds in cheese. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 53: 366-385.

- Matsumiya, Y.,** Kato, N., Watanabe, K., Kato, H. 2002. Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *The Journal of Infection and Chemotherapy*. 8: 43-9.
- Mayo, B.,** Piekarczyk, T.A., Kowalczyk, M., Pablo, A., Bardowski, J. 2010. Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. In *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications*. F. Mozzi, R.R. Raya, G.M. Vignolo (Eds.). Massachusetts: WileyBlackwell.
- McFarland, L.V.,** Dublin, S., 2008. Meta-analysis of probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome. *World Journal of Gastroenterology*.14: 2650-2661.
- McGuire M.K.,** McGuire MA. 2015. Human milk: mother nature's prototypical probiotic food? *Adv Nutr*. 15;6(1):112-23.
- McSweeney, P.L.H.,** Sousa, M.J. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait*. 80: 293-324.
- McSweeney, P.L.H** (Ed.). 2007. *Cheese Problems Solved*. Elsevier.
- McSweeney, P.L.H.** 2004. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*. 57: 127-144.
- McSweeney, P.L.H.,** Fox, P.F. 1997. Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Le lait*, 77: 41-76.
- McSweeney, P.L.H.,** Ottogalli, G., FOX, P.F. 2004. Diversity of cheese varieties: an overview. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (eds.). Academic Press. 2: 1-22.
- McSweeney, P.L.H.,** Sousa, M.J. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait*, 80: 293-324.
- Medici, M.,** Vinderola, C.G., Perdigon, G. 2004. Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese. *International Dairy Journal*.14: 611-618.
- Mierau, I.,** Kunji, E.R., Leenhouts, K.J., Hellendoorn, M.A., Haandrikman, A.J., Poolman, B., Konings, W.N., Venema, G., Kok, J. 1996. Multiple-peptidase mutants of *Lactococcus lactis* are severely impaired in their ability to grow in milk. *Journal of Bacteriology*. 178: 2794-803.
- Milesi, M.M.,** McSweeney, P.L.H., Hynes, E.R. 2008. Viability and contribution to proteolysis of an adjunct culture of *Lactobacillus plantarum* in two model cheese systems: Cheddar cheese-type and soft-cheese type. *Journal of applied microbiology*. 105: 884-892.
- Moles, L.,** Escribano, E., de Andrés, J., Montes, M.T., Rodríguez, J.M., Jiménez, E., Sáenz de Pipaón, M., Espinosa-Martos, I. 2015. Administration of *Bifidobacterium*

- breve* PS12929 and *Lactobacillus salivarius* PS12934, two strains isolated from human milk, to very low and extremely low birth weight preterm infants: a pilot study. *Journal of Immunology Research*. 2015:538171
- Moles, L.,** Gomez, M., Heilig, H., Bustos, G., Fuentes, S., de Vos, W., Fernández, L., Rodríguez, J.M., Jiménez, E. 2013. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PLoS One*. 8: e66986.
- Montville, T.J.,** Chikindas, M.L. 2013. Biological control of foodborne bacteria. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 4th ed. Doyle, M.P., Buchanan, R.L. (eds.). American Society for Microbiology Press, Washington, D.C. 3-18.
- Morrow, A.L.,** Rangel, J.M., Human milk protection against infectious diarrhea: implications for prevention and clinical care. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*. 2004. 15: 221-228.
- Murtaza, M.A.,** Ur-Rehman, S., Anjum, F.M., Huma, N., Hafiz, I. 2014. Cheddar cheese ripening and flavor characterization: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 54: 1309-1321.
- Musilova, S.,** Rada, V., Vlkova, E., Bunesova, V. 2014. Beneficial effects of human milk oligosaccharides on gut microbiota. *Beneficial Microbes*. 5: 273-83
- Nagpal, R.,** Kumar, A., Kumar, M., Behare, P.V., Jain, S., Yadav, H. 2012. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS Microbiology Letters*. 334: 1-15.
- Newburg, D.S.** 2005. Innate immunity and human milk. *The Journal of Nutrition*, 135: 1308-1312.
- Nilsson, O.,** Greko, C., Top, J., Franklin, A., Bengtsson, B. 2009. Spread without known selective pressure of a vancomycin-resistant clone of *Enterococcus faecium* among broilers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63: 868-872.
- Normas de calidad de quesos Real decreto. BOE. 239: 1113-2006
- Ogier, J-C.,** Serror, P. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*. 126: 291-301.
- Olivares, M.,** Díaz-Ropero, M. P., Martín, R., Rodríguez, J. M., Xaus, J. 2006. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *Journal of Applied Microbiology*. 101: 72-79.
- Olivares, M.,** Díaz-Ropero, M. P., Sierra, S., Lara-Villoslada, F., Fonollá, J., Navas, M, Rodríguez, J.M., Xaus, J. 2007. Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition*. 23: 254-260.
- ONG, L.,** Henriksoon, A., Shah, N.P. 2006. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium spp.* and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and

- production of organic acid. *International Dairy Journal*. 16: 446-456
- Paganelli, F. L.,** Willems, R. J., Leavis, H. L. 2012. Optimizing future treatment of enterococcal infections: attacking the biofilm?. *Trends in microbiology*. 20: 40-49.
- Parente, E.,** Villani, F., Coppola, R., Coppola, S. 1989. A multiple strain starter for water-buffalo mozzarella cheese manufacture. *Lait*. 69: 271-279.
- Patel, R.,** Piper, K.E., Rouse, M.S., Steckelberg, J.M., Uhl, J.R., Kohner, P., Hopkins, M.K., Cockerill, F.R., Kline, B.C. 1998. Determination of 16S rRNA sequences of enterococci and application to species identification of nonmotile *Enterococcus gallinarum* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 3399-3407.
- Paul, D.,** Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. 3: 777-788.
- Paulsen, I.T.,** Banerjee, L., Myers, G.S.A., Nelson, K. E., Seshadri, R., Read, T.D., ... & Fraser, C.M. 2003. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*. 299: 2071-2074.
- Pedersen, M.B.,** Gaudu, P., Lechardeur, D., Petit M.A., Gruss A. 2012. Aerobic respiration metabolism in lactic acid bacteria and uses in biotechnology. *The Annual Review of Food Science and Technology*. 3: 37-58.
- Pedersen, T.B.,** Ristagno, D., McSweeney, P.L.H., Vogensen, F.K., Ardö, Y. 2013. Potential impact on cheese flavour of heterofermentative bacteria from starter cultures. *International Dairy Journal*, 33: 112-119.
- Perán, L.,** Sierra, S., Comalada, M., Lara-Villoslada, F., Bailón, E., Nieto, A., Concha, A., Olivares, M., Zarzuelo, A., Xaus, J., Gálvez, J. 2007. A comparative study of the preventative effects exerted by two probiotics, *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*, in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. *British Journal of Nutrition*. 97: 96-103.
- Perán, L.,** Camuesco, D., Comalada, M., Nieto, A., Concha, A., Adrio, J.L., Olivares, M., Xaus, J., Zarzuelo, A., Galvez, J. 2006. *Lactobacillus fermentum*, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis. *Journal of Colorectal Disease*. 21:737-746.
- Perez PF, Doré J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, Serrant P, Donnet-Hughes A. 2007. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics*. 119(3):e724-32.
- Perez, P.F.,** Doré, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., Segura-Roggero, I., Schiffrin, E.J., Donnet-Hughes, A. 2007. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics*: 119: e724-e732.

- Pérez, R.H.**, Zendo, T., Sonomoto, K. 2014. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories*. 13: S3.
- Pérez-Cano F.J.**, Dong H., Yaqoob P. 2010. In vitro immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk. *Immunobiology*. 215: 996-1004.
- Pesavento, G.**, Calonico, C., Ducci, B., Magnanini, A., lo Nostro, A. 2014. Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat. *Food Microbiology*. 41: 1-7.
- Pfeiler, E.A.**, Klaenhammer, T.R. 2007. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology*. 15: 546-53.
- Picon, A.**, De Torres, B., Gaya, P., Nunez, M. 2005. Cheesemaking with a *Lactococcus lactis* strain expressing a mutant oligopeptide binding protein as starter results in a different peptide profile. *International journal of Food Microbiology*. 104: 299-307.
- Picon, A.**, Fernandez-Garcia, E., Gaya, P., Nunez, M. 2008. Modification of the volatile compound profile of cheese, by a *Lactococcus lactis* strain expressing a mutant oligopeptide binding protein. *Journal of Dairy Research*. 75: 30-36.
- Polidori, M.**, Nuccorini, A., Tascini, C., Gemigani, G., Iapoce, R., Leonildi, A., Tagliaferri, E., Menichetti, F. 2011. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) bacteremia in infective endocarditis successfully treated with combination daptomycin and tigecycline. *Journal of Chemotherapy*. 23: 240-241.
- Quigley, L.**, O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D. 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*. 37: 664-698.
- Ramsay, D.T.**, Kent, J.C., Owens, R.A., Hartmann, P.E. 2004. Ultrasound imaging of milk ejection in the breast of lactating women. *Pediatrics*. 113: 361-367.
- Ramsey, M.**, Hartke, A., Huycke, M. 2014. The physiology and metabolism of enterococci. In *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y., Shankar, N. (eds). [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190427].
- Rehaïem, A.**, Martínez, B., Manai, M., Rodríguez, A. 2012. Technological performance of the enterocin A producer *Enterococcus faecium* MMRA as a protective adjunct culture to enhance hygienic and sensory attributes of traditional fermented milk 'Rayeb'. *Food and Bioprocess Technology*. 5: 2140-2150.
- Rescigno, M.**, Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P., Ricciardi-Castagnoli, P. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and

- penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology*. 2: 361-367.
- Reysenbach, A.L.,** Giver, L.J., Wickham, G.S., Pace, N.R. 1992. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 3417-3418.
- Rezaiki, L.,** Cesselin, B., Yamamoto, Y., Vido, K., van West, E., Gaudu, P., Gruss, A. 2004. Respiration metabolism reduces oxidative and acid stress to improve long-term survival of *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*. 53: 1331-1342.
- Rodríguez, J.M.** 2014. The Origin of Human Milk Bacteria: Is There a Bacterial Entero-Mammary Pathway during Late Pregnancy and Lactation?. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*. 5: 779-784.
- Rodríguez, J.M.,** Martínez, M.I., Kok, J. 2002. Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Cience and Nutrition*, 42: 91-121.
- Rosenthal, M.,** Goldberg, D., Aiello, A., Larson, E., Foxman, B. 2011. Skin microbiota: microbial community structure and its potential association with health and disease. *Infection, Genetics and Evolution*. 11: 839-848.
- Ruas-Madiedo, P.,** Hugenholtz, J., Zoon, P. 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 12: 163-171.
- Saavedra, L.,** Sesma, F., de Valdez, G.F. 2003. Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. *International Journal of Food Microbiology*. 88: 241-245.
- Sabia, C., De Niederhäusern, S., Messi, P., Manicardi, G., Bondi, M. (2003). Bacteriocin-producing *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1, a natural antagonist for control of *Listeria monocytogenes* in Italian sausages ("cacciatore"). *International Journal of Food Microbiology*. 87: 173-179.
- Salter, S. J.,** Cox, M. J., Turek, E. M., Calus, S. T., Cookson, W. O., Moffatt, M. F., Turner P, Parkhill J, Loman N.J., Walker, A. W. 2014. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biology*, 12: 87.
- Salveti, E.,** Torriani, S., Felis, G.E. 2012. The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 4: 217-226.
- Sanders, M.E.,** Akkermans, L.M., Haller, D., Hammerman, C., Heimbach, J.T., Hörmannspurger, G., Huys, G. 2010. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes*. 1: 164-185.
- Sanders, M.E.,** Marco, M.L. 2010. Food formats for effective delivery of probiotics. *Food Science and Technology*. 1: 65-85.
- Sarantinopoulos, P.,** Andrighetto, C., Georgalaki, M.D., Rea, M.C., Lombardi, A., Cogan, T.M., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E.

2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal*. 11: 621-647.
- Saxelin, M.**, Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T., de Vos, W.M. 2005. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Current Opinion in Biotechnology*. 16: 204-211.
- Schleifer, K. H.**, Kilpper-Bälz, R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 34: 31-34.
- Settanni, L.**, Moschetti, G. 2010. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*. 27: 691-697.
- Shah, N.P.**, Lankaputhra, W.E. 1997. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in yogurt. *International Dairy Journal*. 7: 349-356.
- Slyepchenko, A.**, Carvalho, A.F., Cha, D.S., Kasper, S., McIntyre, R.S. 2014. Gut Emotions-Mechanisms of Action of Probiotics as Novel Therapeutic Targets for Depression and Anxiety Disorders. *CNS & neurological disorders drug targets*. 13: 1770-1786.
- Smid, E.J.**, Erkus, O., Spus, M., Wolkers-Rooijackers, J.C.M., Alexeeva, S., Michiel, Kleerebezem, M. 2014. Functional implications of the microbial community structure of undefined mesophilic starter cultures. *Microbial Cell Factories*. 13: S2.
- Smit, G.**, Verheul, A., van Kranenburg, R., Ayad, E., Siezen, R., Engels, W. 2000. Cheese flavour development by enzymatic conversions of peptides and amino acids. *Food Research International*. 33: 153-160.
- Smith, M.R.**, Hugenholtz, J., Mikóczi, P., de Ree, E., Bunch, A.W., de Bont, J.A. 1992. The stability of the lactose and citrate plasmids in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. *FEMS Microbiology Letters*. 96: 7-11.
- Soccol, C.R.**, Porto de Souza-Vandenberghe, L., Rigon-Spier, M., Pedroni-Medeiros, A.B., Tiemi Yamaguishi, C., De Dea-Lindner, J., Pandey, A., Thomaz-Soccol, V. 2010. The potential of probiotics: a review. *Biotechnol Food Technology and Biotechnology*. 48: 413-434.
- Solanki, H.K.**, Pawar, D.D., Shah, D.A., Prajapati, V.D., Jani, G.K., Mulla, A.M., Thakar, P.M. 2013. Development of microencapsulation delivery system for long-term preservation of probiotics as biotherapeutics agent. *BioMed Research International*: Article ID 620719, 21 pages.
- Sommer, F.**, Bäckhed, F. 2013. The gut microbiota — masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*. 11: 227-238.
- Soto, A.**, Martín, V., Jiménez, E., Mader, I., Rodríguez, J.M.,

- Fernández, L. 2014. Lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk: influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 59: 78-88.
- Stanton, C.**, Gardiner, G., Lynch, P.B., Collins, J.K., Fitzgerald, G., Ross, R.P. 1998. Probiotic cheese. *International Dairy Journal*. 8: 491-496
- Stiles, M.E.**, Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International journal of food microbiology*. 36: 1-29.
- Talwalkar, A.**, Miller, C.W., Kailasapathy, K., Nguyen, M.H. 2004. Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*. 39: 605-611.
- Tanasupawat, S.**, Sukontasing, S., Lee, J.S. 2008. *Enterococcus thailandicus* sp. nov., isolated from fermented sausage ('mum') in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58: 1630-1634.
- Tanigawa K.**, Watanabe K. 2011. Multilocus sequence typing reveals a novel subspeciation of *Lactobacillus delbrueckii*. *Microbiology*, 157(Pt 3):727-738.
- Tannock, G.W.** 1999. Identification of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Molecular Biology*. 1: 53-64.
- The Human Microbiome Project Consortium.** 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 486: 207-214.
- Thurlow, L.R.**, Thomas, V.C., Fleming, S.D., Hancock, L.E. 2009. *Enterococcus faecalis* capsular polysaccharide serotypes C and D and their contributions to host innate immune evasion. *Infection and Immunity*. 77: 5551-5557.
- Turpin, W.**, Humblot, C., Thomas, M., Guyot, J.P. 2010. Lactobacilli as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. *Int J Food Microbiol*. 143: 87-102.
- Ubeda, C.**, Bucci, V., Caballero, S., Djukovic, A., Toussaint, N.C., Equinda, M., Lipuma, L., Ling, L., Gobourne, A., No, D., Taur, Y., Jenq, R.R., van den Brink, M.R., Xavier, J.B., Pamer, E.G. 2013. Intestinal microbiota containing *Barnesiella* species cures vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization. *Infection and immunity*. 81: 965-73.
- Ubeda, C.**, Taur, Y., Jenq, R.R., Equinda, M.J., Son, T., Samstein, M., Viale, A., Nicholas, D., Succi, N., Marcel, R.M., van den Brink, M.R.M., Kamboj, M., Pamer, E.G. 2010. Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *Journal of Clinical Investigation*. 120: 4332-4341.
- Van Kranenburg, R.**, Kleerebezem, M., van Hylckama Vlieg, J.E.T.,

- Ursing, B.M., Boekhorst, J., Smit, B.A., Ayad, E.H.E., Smit, G. and Siezen, R.J. 2002. Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: Predictions from genome sequence analysis. *International Dairy Journal*. 12: 111-121.
- Van Schaik, W.,** Willems, R.J. 2010. Genome-based insights into the evolution of enterococci. *Clinical Microbiology and Infection*. 16: 527-532.
- Vaughan, E. E.,** David, S., Harrington, A., Daly, C., Fitzgerald, G. F., De Vos, W. M. 1995. Characterization of plasmid-encoded citrate permease (citP) genes from *Leuconostoc* species reveals high sequence conservation with the *Lactococcus lactis* citP gene. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 3172-3176.
- Vázquez-Fresno, R.,** Llorach, R., Marinic, J., Tulipani, S., Garcia-Aloy, M., Espinosa-Martos, I, Jiménez, E., Rodríguez, J.M., Andres-Lacueva, C. 2014. Urinary metabolomic fingerprinting after consumption of a probiotic strain in women with mastitis. *Pharmacological Research*. 87: 160-165.
- Von Wright, A.,** Axelsson, L. 2011. Lactic acid bacteria: an introduction. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, CRC Press, London, 1-17.
- Vu, J.,** Carvalho, J. 2011. *Enterococcus*: review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology. *Frontiers in Biology* 6: 357-366.
- Walker, W.A.,** Iyengar, R.S. 2015. Breast milk, microbiota, and intestinal immune homeostasis. *Pediatric Research*. 77: 220-228.
- Walter, J.** 2008. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 4985-4996.
- Walzem, R.L.,** Dillard, C.J., German, J.B. 2002. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 42: 353-375.
- Wang, Y.,** Hoenig, J.D., Malin, K.J., Qamar, S, Petrof, E.O, Sun, J, Antonopoulos, D.A., Chang, E.B., Claud, E.C. 2009. 16S rRNA gene-based analysis of fecal microbiota from preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *ISME Journal*. 3: 944-954.
- Xuan, C.,** Shamonki, J.M., Chung, A., Dinome, M.L., Chung, M., Sieling, P.A., Lee, D.J. 2014. Microbial dysbiosis is associated with human breast cancer. *PLoS One*. 9: e83744.
- Yang, S.C.,** Lin, C.H., Sung, C.T., Fang, J.Y. 2014. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in microbiology*, 5.
- Yoon, M.Y.,** Kim, Y.J., Hwang, H-J. 2008. Properties and safety aspects of *Enterococcus faecium* strains isolated from Chungkukjang , a

fermented soy product. *LWT - Food Science and Technology*. 41: 925-933.

Zaph, C. 2010. Which species are in your feces?. *The Journal of Clinical Investigation*, 120: 4182.

Zaura, E., Nicu, E.A., Krom, B.P., Keijser, B.J. 2014. Acquiring and maintaining a normal oral microbiome: current perspective. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4:85.

Zhang, X., Vrijenhoek, J.E., Bonten, M.J., Willems, R.J., van Schaik, W. 2011. A genetic element present on megaplasms allows *Enterococcus faecium* to use raffinose as carbon source. *Environ Microbiol* .13 :518-528.

Zhang, Z.G., Ye, Z.Q., Yu, L., Shi, P. 2011. Phylogenomic reconstruction of lactic acid bacteria: an update. *BMC Evolutionary Biology*. 11:1.

XII. RESUMEN AMPLIADO¹

¹Este resumen ampliado se presenta en cumplimiento de las directrices de la normativa de desarrollo del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, que regula los estudios de doctorado en la Universidad Complutense de Madrid (UCM) (BOUC nº 14, de 21 de diciembre de 2012) y de acuerdo con las especificaciones establecidas por la Comisión de Doctorado de la UCM.

XII.1 INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) comprenden un conjunto heterogéneo de bacterias Gram-positivas, catalasa negativas, aerotolerantes, no formadoras de esporas, inmóviles y tolerantes a los medios ácidos, que producen ácido láctico como principal producto final del metabolismo de los glúcidos (Fellis y Dellaglio, 2007). Este grupo incluye muchos géneros diferentes, aunque los que tienen mayor interés comercial se encuentran dentro de las familias *Lactobacillaceae* (*Lactobacillus* y *Pediococcus*), *Leuconostocaceae* (*Oenococcus* y *Leuconostoc*), *Enterococcaceae* (*Enterococcus*) y *Streptococcaceae* (*Lactococcus* y *Streptococcus*) (Stiles y Holzapfel, 1997; Doyle *et al.*, 2013). Las BAL se han adaptado y se encuentran en muchos nichos ecológicos ricos en nutrientes, desde los alimentos (leche, carne, cereales) a las mucosas (cavidad oral, tracto gastrointestinal, vagina) de diversas especies animales (Douillard y de Vos, 2014).

Las bifidobacterias son bacterias Gram-positivas, anaeróbicas (aunque existen algunas especies microaerofílicas), que no forman esporas, inmóviles y, frecuentemente, con morfología ramificada. Las bifidobacterias no están relacionadas filogenéticamente con las BAL y aunque también producen ácido, lo hacen siempre en combinación con ácido acético, como consecuencia de la fermentación de los glúcidos por medio de la ruta de la fructosa-6-fosfato. Las bifidobacterias generalmente se encuentran asociadas con la cavidad oral, el tracto gastrointestinal y la vagina de los mamíferos (Fellis y Dellaglio, 2007).

Las BAL tienen una gran importancia económica porque son las bacterias utilizadas con mayor frecuencia en la fermentación de alimentos, tanto a nivel artesanal como industrial, y sobre todo en la producción de productos lácteos (yogur, queso, mantequilla, leches fermentadas, suero de mantequilla fermentado, kéfir...). La rápida producción de ácidos orgánicos, el agotamiento de nutrientes en la leche y/o la producción de distintos compuestos con actividad antimicrobiana, como por ejemplo las bacteriocinas, tienen un efecto conservador al controlar el crecimiento de los microorganismos alterantes (Carr *et al.*, 2002; Moll *et al.*, 1999). De hecho, las BAL se están utilizando como agentes para el biocontrol en alimentos; su calificación QPS (Presunción Cualificada de Seguridad, del inglés *Qualified Presumption of Safety*) en la Unión Europea y GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro, del inglés *Generally Regarded as Safe*) en EE. UU. hacen que sean una alternativa muy atractiva a los métodos tradicionales de conservación (Gálvez *et al.*, 2007; Elsser-Gravesen y Elsser-Gravesen, 2014).

Las BAL empleadas como cultivos iniciadores y/o adjuntos también contribuyen al desarrollo del sabor, aroma y textura adecuados en el producto final (Leroy y de Vuyst, 2004; Reginensi *et al.*, 2013). Por ello, muchas de sus propiedades tecnológicas son criterios importantes para la selección de nuevos cultivos incluyendo, entre otros,

el metabolismo de la lactosa, las actividades proteínasa, peptidásicas y esterásicas, la producción de compuestos volátiles, la resistencia a los bacteriófagos y la producción de compuestos con actividad antimicrobiana (Doyle *et al.*, 2013). De hecho, el control de las actividades peptidásicas de las BAL es una diana clave en la tecnología de maduración del queso (Beresford, 2004).

Además, las BAL y las bifidobacterias han estado asociadas durante siglos con distintos beneficios para la salud derivados del consumo de productos lácteos fermentados y algunas cepas son bien conocidas por sus características probióticas (Aureli *et al.*, 2011). Los probióticos se definen como “*microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas proporcionan un beneficio para la salud del consumidor*” (FAO/WHO, 2001). Precisamente son estos microorganismos los más frecuentemente utilizados en la elaboración de alimentos probióticos, principalmente por parte de la industria láctea (Shiby y Mishra, 2013).

Varios estudios han confirmado que la leche materna es una buena fuente de BAL y bifidobacterias, entre las que se incluyen cepas de *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium adolescentis* o *Bifidobacterium bifidum* (Heikkilä y Saris, 2003; Jiménez *et al.*, 2008; Martín *et al.*, 2007; Martín *et al.*, 2009). El origen de estos microorganismos es particularmente atractivo para su uso en la industria láctea; de hecho, la leche humana se ha considerado como una fuente importante para la selección de bacterias probióticas (Martín *et al.*, 2005a; Fontana *et al.*, 2013).

XII.2 OBJETIVOS

En consecuencia, los objetivos de esta Tesis Doctoral fueron:

1. Evaluar algunas propiedades tecnológicas de interés para la industria láctea en una colección de bacterias lácticas y bifidobacterias aisladas de leche humana y compararlas con las de con bacterias lácticas y bifidobacterias aisladas de otras fuentes.

2. Estudiar las propiedades tecnológicas y potencialmente probióticas en una colección de cepas de *Lactobacillus gastricus* previamente aisladas de leche humana obtenida de mujeres sanas, orientadas hacia su uso en la elaboración de productos lácteos.

3. Secuenciar el genoma completo de *L. gastricus* PS3 para obtener su secuencia genética. Esto permitirá entender su biología y caracterizar los genes que podrían proporcionar propiedades ventajosas desde el punto de vista tecnológico y en cuanto a los beneficios para la salud.

3. Valorar la relación entre la dotación genética de *L. fermentum* CECT5716 y ciertas características fenotípicas, incluyendo producción de compuestos antimicrobianos, la biosíntesis de vitaminas del grupo B y glutatión, las actividades glicosidásicas, la presencia de profagos y la existencia de genes de resistencia a compuestos antimicrobianos.

4. Determinar el comportamiento de *L. salivarius* CECT 5713 y *L. salivarius* PS2, dos cepas aisladas de leche humana, en quesos frescos para desarrollar un queso probiótico.

5. Analizar algunos rasgos de relevancia tecnológica de *E. faecium* LJx4, una cepa previamente aislada de leche humana, para evaluar su posible aplicación como cultivo iniciador y/o adjunto en productos lácteos fermentados.

XII.3 MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se ha empleado una colección de BAL y bifidobacterias previamente aisladas de leche de mujeres sanas (Martín *et al.*, 2003; Martín *et al.*, 2011; Martín *et al.*, 2012; Marín *et al.*, 2009; Reviriego *et al.*, 2005). Las bacterias se cultivaron de forma rutinaria en caldo De Man, Rogosa y Sharpe (MRS, Oxoid, Basinstoke, REINO UNIDO), suplementándolo cuando fue necesario con L-cisteína al 0,25% (p/v) (MRS-Cys), a 37°C en condiciones aeróbicas o anaeróbicas (85% N₂, 10% H₂, y 5% CO₂). Cuando se requirió, el caldo MRS-Cys se preparó a partir de los ingredientes sustituyendo la glucosa por una cantidad equivalente de celobiosa, lactosa, maltosa o rafinosa. Cuando se indica, las cepas se cultivaron en leche en polvo desnatada reconstituida al 10% (p/v) y tratada con calor (121°C, 5 min) (HT-RSM, del inglés *Heat-Treated Reconstituted Skimmed Milk*). El recuento de bacterias viables se hizo sembrando las diluciones adecuadas en placas de agar.

Los perfiles de fermentación de carbohidratos y de actividades enzimáticas se determinaron utilizando el sistema API 50 CH y las galerías API Zym (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia), respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

La actividad acidificante se evaluó en HT-RSM después de la inoculación (1%, v/v) con un cultivo en medio MRS o MRS-Cys de la cepa correspondiente. El pH y la actividad acidificante de las cepas se determinaron al cabo de 6, 12 y 24 h de incubación a 30°C en aerobiosis. La acidez titulable de los cultivos en HT-RSM se determinó por titulación con NaOH 0,11 M en presencia de fenolftaleína y se expresó como la cantidad de ácido láctico producido (g/100 mL de leche).

La actividad proteolítica se evaluó mediante el ensayo espectrofotométrico OPA (*o*-oftalaldehído) utilizando HT-RSM, siguiendo el método descrito por Church *et al.* (1983). Los resultados se expresaron como el aumento en la DO₃₄₀ con respecto al control sin inocular.

Las actividades peptidásicas, esterásicas y glicosidásicas se determinaron en extractos intracelulares (CFE, del inglés *Cell-Free Extracts*) después de adaptar los métodos a un formato de placa multipocillo. El contenido de proteína en los CFEs se calculó con un reactivo comercial (Bio-Rad Laboratories, Madrid, España) basado en el ensayo de Bradford empleando seroalbúmina bovina como estándar. Las actividades peptidásicas se investigaron con derivados *p*-nitroanilida de alanina, leucina, lisina, prolina y glicil-prolina (Ala-*p*NA, Leu-*p*NA, Lys-*p*NA, Pro-*p*NA y Gly-Pro-*p*NA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) según el método descrito por Sarantinopoulos *et al.* (2001). Las actividades esterásicas se estudiaron empleando el método descrito por Abeijón *et al.* (2009) empleando derivados α -naftil (α NA) de acetato, propionato, butirato y caproato (α NA-C₂, α NA-C₃, α NA-C₄ y α NA-C₆) (Sigma). Las actividades glicosidásicas se ensayaron de acuerdo con el método descrito por Grimaldi *et al.* (2005) empleando derivados *p*-nitrofenil (*p*NP) de α -D-

glucopiranosido, β -D-glucopiranosido, α -D-galactopiranosido y β -D-galactopiranosido (*p*NP- α Glu, *p*NP- β Glu, *p*NP- α Gal y *p*NP- β Gal) (Sigma). La actividad enzimática específica se expresó como la cantidad de sustrato hidrolizado por mg de proteína en el CFE y tiempo (minuto u hora) de incubación.

La producción de los ácidos L-láctico, D-láctico y acético se determinó en los sobrenadantes de los cultivos empleando kits enzimáticos (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para evaluar la producción de compuestos con actividad antimicrobiana se empleó el método descrito por Magnusson y Schnürer (2001), que permite medir para cada microorganismo indicador el diámetro de la zona de inhibición alrededor de la estría de la bacteria que se evalúa. La actividad bacteriocina se midió empleado un método de difusión en agar con pocillos según describieron Martín *et al.* (2006). La producción de peróxido de hidrógeno se ensayó siguiendo los procedimientos descritos por Song *et al.* (1999) y Yap y Gilliland (2000).

La tolerancia al ácido se determinó en caldo de cultivo cuyo pH se había ajustado a un valor de 6, 4 ó 2 utilizando HCl. Después de inocular el medio con un cultivo en fase estacionaria (1%, v/v), las mezclas se incubaron a 37°C durante 2 h. La supervivencia en presencia de sales biliares se evaluó en caldo de cultivo y en HT-RSM suplementados con 0,1, 0,2 y 0,5% (p/v) de sales biliares porcinas (Sigma). Las bacterias viables se estimaron antes y después de la incubación mediante recuentos en placa.

La adhesión a mucina se ensayó de acuerdo con el método descrito por Cohen y Laux (1995) empleando mucina porcina (Sigma) inmovilizada en los pocillos de placas multipocillo de poliestireno (Maxisorp; Nunc, Roskilde, Dinamarca) y bacterias marcadas con carboxifluoresceína (Sigma). Después de lavar las placas para eliminar las células no adheridas, se midió la fluorescencia en un lector adaptado para placas multipocillo (Tecan Austria GMBH, Salzburg, Austria).

La capacidad para producir aminos biógenos se evaluó en placas de agar MRS preparadas a partir de los distintos componentes y añadiendo un aminoácido precursor (tirosina, histidina, ornitina o lisina) y un indicador de pH de la forma descrita por Bover-Cid y Holzapfel (1999).

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los agentes antimicrobianos se determinaron mediante un método de microdilución empleado placas microtituladoras VetMIC para BAL (National Veterinary Institute of Sweden, Uppsala, Suecia). La CMI se definió como la concentración más baja a la que no se observó crecimiento después de una incubación a 37°C durante 48 h. Los valores CMI se compararon con los valores de corte establecidos por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2012).

Para comprobar la estabilidad de las bacterias durante diferentes condiciones de almacenamiento, las células de cultivos en fase estacionaria se lavaron con tampón fosfato salino y se resuspendieron en HT-RSM al 10% (p/v) para lograr una concentración de 10^9 – 10^{10} unidades formadoras de colonias (ufc) mL^{-1} . Las suspensiones de bacterias se refrigeraron y almacenaron a 3 y 8°C durante 28 días, se congelaron y almacenaron a -20 y -80°C durante un total de 6 meses, o se liofilizaron y almacenaron a 3 y 25 °C hasta un total de 6 meses. La viabilidad de las bacterias se determinó a intervalos regulares mediante recuento en placa.

El genoma de *L. gastricus* PS3 se secuenció por pirosecuenciación en un secuenciador GS-FLX (454 Life Sciences, Brandford, CT, EE. UU.). El ensamblaje inicial para generar los contigs se hizo con el programa Newbler versión 2.3 (Roche). La predicción de las regiones codificantes se llevó a cabo mediante el sistema BG7 (Era7 Technologies, Granada, España).

Los quesos experimentales se elaboraron con leche de vaca comercial pasterizada (tratamiento HTST; a alta temperatura durante un tiempo corto, del inglés *High Temperature Short Time*) (Ganadería Priégola SA, Villanueva del Pardillo, Madrid, España) siguiendo un procedimiento a escala de laboratorio. *Lc. lactis* ESI 153 (Cogan *et al.*, 1997; $\sim 9 \log_{10}$ ufc mL^{-1}) se empleó como cultivo iniciador y el cuajo (Fromase, 44 IMCU/L; DSM Food Specialities, Seclin Cedex, Francia) se añadió a la leche 30 min antes de añadir el cultivo iniciador. La cuajada se cortó 40 min después de la adición del cuajo y se calentó a 38°C durante otros 40 min. El suero se eliminó y, cuando se requirió, el cultivo liofilizado de *L. salivarius* CECT 5713 o *L. salivarius* PS2 se añadió a los granos de cuajada hasta lograr una concentración final de $\sim 8 \log_{10}$ ufc g^{-1} antes del moldeado. Los quesos se prensaron durante 16 h a temperatura ambiente y se salaron durante 3 h en una salmuera al 15% (p/v). Los quesos resultantes (~ 190 g) se cortaron en piezas que se envasaron individualmente al vacío en bolsas plásticas Cryovac y se mantuvieron refrigerados a 4°C durante 28 días. En las muestras de queso se midió el pH, la actividad de agua (a_w), la humedad, la grasa, la proteína y el contenido en cenizas.

La viabilidad de las cepas de *L. salivarius* en el queso se estimó mediante recuento en placas de agar MRS conteniendo 0,002% (p/v) de azul de bromofenol tras una incubación de 24 h a 37°C, mientras que el recuento de *Lc. lactis* ESI 153 se hizo en placas de agar M17 (Oxoid) con glucosa al 0,5% (p/v) (GM17) incubadas durante 24 h a 32°C. Para confirmar la identidad de las colonias, las bacterias se observaron al microscopio para comprobar su morfología y se comprobó su comportamiento frente a la tinción de Gram antes de realizar el tipado mediante la técnica de amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD, del inglés *Random Amplification of Polymorphic DNA*) con el cebador OPL5 (5'-ACG CAG GCA C-3') (Ruíz-Barba *et al.*, 2005). Un total de 10 aislados escogidos al azar con el mismo perfil de RAPD se analizaron

mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, del inglés, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) según el procedimiento descrito por Martín *et al.* (2012).

El aislamiento del DNA bacteriano total a partir de las muestras de queso se hizo de acuerdo con lo descrito por Moles *et al.* (2013), después de su homogenización en citrato sódico. El análisis mediante la técnica de PCR combinada con la electroforesis en geles de gradiente de desnaturalización (PCR DGGE, del inglés *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) se hizo tras la amplificación con las parejas de cebadores U968-GC-f (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC-3') y L1401-r (5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3') (Nübel *et al.*, 1996) y Lab159f (5'-GGA AAC AGG TGC TAA TAC CG-3') y Uni-515-GCr (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAT CGT ATT ACC GCG CTG CTG GCA C-3') (Heilig *et al.*, 2002) de la región V6-V8 del gen que codifica la fracción 16S del rRNA bacteriano. El programa de amplificación fue: 95°C durante 2 min, 35 ciclos de 95°C durante 30 s, 56°C durante 40 s y 72°C durante 60 s, y finalmente 72°C durante 5 min. Los fragmentos de PCR se separaron mediante DGGE empleando el sistema DCode System (BioRad Laboratories, Inc., Hercules, California, EE. UU.) y geles con un gradiente desnaturalizante lineal de 30 a 50% según describieron Martín *et al.* (2009).

El análisis del perfil de textura de los quesos se realizó en un texturómetro TA-XT2i (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, Reino Unido) dotado de una célula de carga de 0,2 N y una sonda con un diámetro de 20 mm que se desplazaba a una velocidad de 5 mm s⁻¹ para realizar una compresión uniaxial en dos compresiones consecutivas. Las muestras de queso se prepararon cortando cubos (2 cm³), se colocaron entre las dos placas paralelas y se comprimieron al 50% de la altura original de la muestra. Los parámetros dureza, cohesividad, adhesividad, elasticidad, gomosidad y masticabilidad se determinaron a partir de la gráfica de representación fuerza-tiempo con la ayuda del programa informático Texture Expert version 1.20 (Stable Micro Systems Ltd, Hamilton, MA, EE. UU.). El color de las muestras de queso (superficie y centro) se determinó con un analizador de color triestímulo (Minolta Chroma Meter CR300; Minolta Corporation, Ramsey, NJ, EE. UU.) y los resultados se expresaron con el espacio CIE L*a*b (CIELAB).

Los compuestos volátiles se extrajeron de las muestras de queso por microextracción en fase sólida del espacio de cabeza y se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS; HP6890-MSD HP 5973, Agilent, Palo Alto, CA, EE. UU.) según el método descrito por Lee *et al.* (2003). La identificación de los volátiles se basó en la comparación de espectros empleando la biblioteca Wiley 275 Library (Wiley and Sons Inc., New York, NY, EE. UU.). La abundancia relativa de los compuestos se expresó como el porcentaje del área del pico en relación con el área del pico de la ciclohexanona.

La evaluación sensorial se realizó utilizando como jueces empleados y estudiantes del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos (Universidad Complutense de Madrid). En la prueba triangular participaron 30 jueces semientrenados para determinar si los quesos probióticos elaborados con lactobacilos diferían en cualquier aspecto del queso control. Más tarde, 18 jueces entrenados evaluaron diversos descriptores relacionados con el olor, aroma y sabor, textura y aspecto.

La inhibición de *Listeria innocua* SA1 por *E. faecium* LJx4 en cultivos en HT-RSM (10%, p/v), empleando como control *Lc. lactis* ESI 153, una bacteria no productora de bacteriocina. Cada uno de los tres lotes iniciales (200 mL) de HT-RSM fue inoculado con *E. faecium* LJx4 ($\sim 8 \log_{10}$ ufc mL⁻¹), *Lc. lactis* ESI 153 ($\sim 8 \log_{10}$ ufc mL⁻¹) o *L. innocua* SA1 ($\sim 2.5 \log_{10}$ ufc mL⁻¹). Al mismo tiempo, otros dos lotes se inocularon simultáneamente con las mismas cantidades de *L. innocua* SA1, por una parte, y de *E. faecium* LJx4 o *Lc. lactis* ESI 153, por otra. Cada lote se repartió en tubos (20 mL) que se mantuvieron a 30°C; a las 0, 4, 8, 12 y 16 h, se determinó el pH y el recuento bacteriano. El recuento de enterococos se hizo en placas de agar Kanamicina Esculina Azida (KAA del inglés *Kanamycin Aesculin Azide*; Oxoid), que se incubaron a 37°C durante 24 h, el de lactococos en placas de agar GM17 incubadas a 32°C durante 24 h, y el de *Listeria* en placas de agar PALCAM (BioMérieux) incubadas a 32°C durante 48 h.

Para comprobar la actividad anti-*Listeria* de *E. faecium* LJx4 en queso, se inocularon cuatro lotes con un cultivo de *E. faecium* LJx4 (1%, v/v); dos de ellos se coinocularon con *L. innocua* SA1 ($\sim 3 \log_{10}$ ufc mL⁻¹) mientras que los dos restantes sirvieron como controles. Paralelamente, otros cuatro lotes se inocularon con *Lc. lactis* ESI 153 (1%, v/v); dos de ellos se coinocularon con *L. innocua* SA1 ($\sim 3 \log_{10}$ ufc mL⁻¹) y los otros dos sirvieron de controles. Finalmente, dos lotes se inocularon sólo con *L. innocua* SA1 ($\sim 3 \log_{10}$ ufc mL⁻¹). Los quesos se procesaron como se describió anteriormente y se tomaron muestras para hacer el recuento de enterococos, lactococos y *Listeria*.

El recuento de bacterias viables se registró como ufc mL⁻¹ o ufc g⁻¹ y los datos se transformaron a valores logarítmicos decimales. Los resultados experimentales se presentan como valores medios y desviaciones estándar. Antes del análisis se comprobó la normalidad de los datos y la homogeneidad e independencia de la varianza. La significancia de las diferencias entre medias se valoró empleando un análisis de varianza multifactorial, seguido de un test de Scheffe para comparar las medias. Cuando las variables no se ajustaban a las premisas anteriores, se emplearon tests para medidas no paramétricas (test de Kruskal-Wallis o test de rangos múltiples de Tukey). El nivel de significancia se estableció a un valor de $P < 0,05$. Estos análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico StatGraphics Centurion XVI versión 16.1.15 (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, Virginia, EE. UU.).

XII.4 RESULTADOS

4.1. Propiedades tecnológicas básicas de BAL y bifidobacterias aisladas de leche humana

En esta Tesis Doctoral se evaluaron diversas propiedades tecnológicas relevantes para la industria láctea en una colección de 36 cepas que incluía especies de los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Lactococcus* y *Bifidobacterium*, todas ellas aisladas de leche humana. Las cepas analizadas mostraron una gran variabilidad en relación a su actividad acidificante y a sus actividades proteolítica, peptidásicas y esterásicas se encontró una gran variabilidad. Globalmente, la mayor parte de las BAL y bifidobacterias analizadas acidificaron la leche, aunque cinco fueron incapaces de producir ácido. Las cepas de las especies *Streptococcus salivarius*, *E. faecalis* y *Lc. lactis* (14 cepas) fueron las que mostraron la mayor capacidad acidificante, aunque su producción de ácido fue inferior a la observada con cepas de BAL aisladas de productos lácteos.

Las cepas más proteolíticas pertenecían a la especie *E. faecalis*; las cepas de *Lactobacillus* tenían una actividad proteolítica intermedia, pero muy variable, mientras que el resto de las cepas (estafilococos, dos bifidobacterias y un lactococo) tenían escasa o nula capacidad para hidrolizar la caseína. Con respecto a las actividades peptidásicas, *S. salivarius* ZL49-18 mostró la actividad peptidásica más intensa con todos los sustratos ensayados; su actividad fue comparable a la de *Lactobacillus helveticus* CNRZ32, una cepa empleada comercialmente como cultivo adjunto para la elaboración de queso. Otras cepas de *S. salivarius* y algunas de *L. salivarius* también tuvieron una actividad intensa con alguno de los sustratos ensayados. En general, la actividad esterásica fue baja en todas las cepas ensayadas, a excepción de los estafilococos y las cepas de *Lactobacillus gastricus*; los enterococos y otros lactobacilos tuvieron muy escasa actividad esterásica, algo similar a lo observado en cepas de esos mismos géneros aisladas de otras fuentes. Globalmente, las diferencias observadas en las propiedades tecnológicas analizadas en este estudio se relacionaron más con el grupo taxonómico al que pertenecía la cepa que con su origen (leche humana u otro origen).

4.2. Caracterización de una colección de cepas de *L. gastricus*

En una colección de cepas de *L. gastricus* previamente aisladas de leche humana se evaluaron algunas propiedades tecnológicas (capacidad de crecer en leche, actividad acidificante, algunas actividades enzimáticas) y potencialmente probióticas (potencial antimicrobiano, resistencia al tránsito a través del tracto gastrointestinal), así como otras propiedades relacionadas con su seguridad (producción de aminos biógenas, resistencia a antibióticos) y estabilidad durante el almacenamiento, para evaluar su potencial aplicación en la industria láctea. Se observó una gran variabilidad en la mayor parte de las propiedades estudiadas. Ninguna de las cepas produjo la

coagulación de la leche después de 24 h a 30°C y su actividad proteolítica fue escasa. La actividad peptidásica más intensa fue aquella que actuaba sobre Gly-Pro-pNA, de acuerdo con análisis previos presentados en esta Tesis Doctoral con otras cepas de *L. gastricus*, mientras que los sustratos preferidos para la actividad esterásica fueron el propionato y el butirato. La mayoría de las cepas de *L. gastricus* produjeron entre un 70 y un 87% del isómero ácido L-láctico así como cantidades detectables de ácido acético. La actividad antimicrobiana de las cepas de *L. gastricus* no se relacionó con la producción de bacteriocinas o peróxido de hidrógeno. Estas cepas resistieron las condiciones del tracto gastrointestinal cuando iban en un medio lácteo, fueron capaces de adherirse a la mucina porcina y no produjeron aminas biógenas en las condiciones analizadas. La mayoría de las cepas fueron susceptibles a los antibióticos con relevancia clínica, aunque los valores de CIM de tres cepas fueron superiores a los valores de corte para eritromicina, estreptomicina y/o kanamicina para las especies de lactobacilos fermentativos. La estabilidad de las cepas de *L. gastricus* fue buena (disminuyó menos de 1 ciclo logarítmico) durante un periodo de seis meses a -20 ó -80°C o a 3°C después de la liofilización, pero no fue satisfactoria (una disminución entre 3 y 5 ciclos logarítmicos) cuando las preparaciones liofilizadas se almacenaron a temperatura ambiente (~25°C).

4.3. Secuenciación del genoma de *L. gastricus* PS3

El ensamblaje inicial realizado después de la secuenciación completa del genoma de *L. gastricus* PS3 generó 93 contigs que se pudieron reducir a un número final de 80 al hacer la anotación semiautomática de las secuencias. El genoma de *L. gastricus* PS3 tiene un tamaño de 1.904.872 bases con un contenido medio de G+C de 41,8%. Contiene un total de 1.269 secuencias que codifican para proteínas y 43 que codifican RNA (40 tRNAs y 3 rRNAs). En el genoma se identificaron genes que codificaban posibles sistemas de transporte y enzimas relacionadas con la utilización de distintos carbohidratos (fructosa, galactitol, manosa, lactosa, celobiosa, sacarosa y β -glucósidos). También se predijeron más de 20 proteasas y peptidasas y varios sistemas de transporte de péptidos, así como genes que codificaban dos posibles esterases y una enzima lipolítica del tipo GDSL. Asimismo, se identificó la existencia de tres secuencias codificantes para tres glutamato-cisteín ligasas y una glutamato descarboxilasa.

4.4. Relación entre el genoma y las propiedades fenotípicas de *L. fermentum* CECT5716

Lactobacillus fermentum es una especie heterofermentativa que se encuentra con frecuencia en el tracto gastrointestinal humano. Recientemente se ha secuenciado el genoma de *L. fermentum* CECT5716 (Jiménez *et al.*, 2010), por lo que en esta Tesis Doctoral se ha estudiado la relación entre la dotación genética de la cepa y ciertos rasgos fenotípicos. *L. fermentum* CECT5716 no contiene plásmidos y no tuvo

capacidad para producir bacteriocinas ni aminas biógenas. Sin embargo, fue capaz de producir grandes cantidades de ácidos orgánicos, incluyendo ambos enantiómeros del ácido láctico (L- y D-) y ácido acético. La cepa sintetizó cantidades relativamente elevadas de glutatión. En el genoma de *L. fermentum* CECT5716 se encontraron un total de cuatro genes que codificaban para posibles enzimas con actividad glutamato-cisteín ligasa, que permitirían la condensación del ácido L-glutámico con L-cisteína, y una enzima con actividad glutatión sintetasa, que daría lugar a la síntesis de glutatión. Esta cepa no sólo creció en ausencia de vitaminas B₂ y B₆, sino que mostró la capacidad de sintetizarlas, pudiéndose localizar los genes responsables de su biosíntesis en el cromosoma. *L. fermentum* CECT5716 no produjo cianocobalamina y tampoco se encontraron los genes implicados en su biosíntesis. No se pudo inducir ningún profago y la cepa fue sensible a todos los antibióticos propuestos por la EFSA; además, no se detectó la existencia de genes transmisibles relacionados con la resistencia a antibióticos. Por último, *L. fermentum* CECT5716 estimuló moderadamente la maduración de células dentríticas de ratón. La comparación con el genoma de *L. fermentum* IFO3956 reveló la presencia de 15 genes que codificaban para proteínas que sólo se encontraban en el de *L. fermentum* CECT5716.

4.5. Un queso potencialmente probiótico elaborado con *L. salivarius* CECT 5713 y *L. salivarius* PS2

En esta Tesis Doctoral también se evaluó el comportamiento de dos cepas de *L. salivarius* (CECT 5713 y PS2), previamente aisladas de leche humana y con un elevado potencial probiótico, durante la producción de queso fresco y su posterior almacenamiento durante 28 días a 4°C. Ambas cepas permanecieron viables en los quesos a lo largo de todo el periodo de almacenamiento y sólo se observó una reducción significativa del recuento de células viables después de 21 días. Los perfiles obtenidos por PCR-DGGE indicaron que las cepas inoculadas (*Lc. lactis* ESI 153 como cultivo iniciador y *L. salivarius* CECT 5713 o *L. salivarius* PS2 como probiótico) eran las predominantes en los respectivos quesos durante el almacenamiento. Globalmente, la adición de las cepas de *L. salivarius* no provocó cambios significativos en la composición química, el pH y la actividad de agua del queso. Los parámetros relacionados con la textura (dureza, cohesividad, adhesividad, elasticidad, gomosidad y masticabilidad) fueron similares en los quesos control y en los que contenían los probióticos al final del periodo de almacenamiento, aunque los elaborados con *L. salivarius* CECT 5713 tenían valores de dureza más elevados. Se identificaron un total de 59 compuestos volátiles en el espacio de cabeza de los quesos experimentales, incluyendo aldehídos, cetonas, alcoholes, ésteres, alcanos y ácidos grasos, y se constataron algunas diferencias relacionadas con la presencia de las cepas de *L. salivarius*. Todos los quesos tuvieron buenos valores de aceptación tras el análisis sensorial. Globalmente, los resultados obtenidos indicaron que el queso fresco puede ser un buen vehículo para las dos cepas de *L. salivarius* analizadas en este estudio.

4.6. Propiedades tecnológicas de *E. faecium* LJx4 de interés para la industria láctea

Finalmente, se analizaron distintas propiedades bioquímicas de *E. faecium* LJx4, una cepa igualmente aislada de leche humana. Sus capacidades acidificante y proteolítica fueron bajas y comparables a las de otras cepas de enterococos y lactococos relacionados con la industria láctea. Sin embargo, mostraron actividades peptidásicas y esterásicas notables, aunque no lipásica. Los perfiles de compuestos volátiles detectados en los quesos elaborados con *E. faecium* LJx4 y en los elaborados con el cultivo iniciador *Lc. lactis* ESI 153 fueron idénticos, aunque se encontraron importantes diferencias cuantitativas en la concentración de algunos compuestos. Los compuestos volátiles más abundantes en el queso experimental elaborado con *E. faecium* LJx4 fueron el etanol y la 3-hidroxi-2-butanona. Esta cepa inhibió el crecimiento *in vitro* de varias cepas de *Listeria monocytogenes* y *L. innocua*. Aunque *E. faecium* LJx4 controló el crecimiento de *Listeria* en modelos de leche fermentada y queso coinoculados con *L. innocua* SA1 ($2.5-3 \log_{10} \text{ ufc mL}^{-1}$), la reducción conseguida en la población de *Listeria* fue inferior que en los quesos elaborados con *Lc. lactis* ESI 153. En conclusión, los resultados obtenidos indican que *E. faecium* LJx4 podría ser útil como cultivo adjunto y/o bioprotector para la elaboración de productos lácteos.

XII.5 DISCUSIÓN

5.1. Potencial tecnológico de una colección de bacterias aisladas de leche humana

En esta Tesis Doctoral se han evaluado distintas propiedades de diversas bacterias lácticas aisladas de leche humana con el objetivo de evaluar su posible aplicación en la industria láctea. En general se observó una gran variación en cuanto a las propiedades tecnológicas ensayadas (acidificación, proteólisis y actividades peptidásicas y esterásicas) entre las cepas aisladas de leche humana y analizadas en este estudio. Es habitual observar una elevada variación incluso dentro de cepas de la misma especie cuando se estudian las propiedades tecnológicas de cepas “salvajes” como por ejemplo las aisladas de leche cruda y queso artesanal. Por ello estas fuentes se han empleado en numerosas ocasiones para aislar bacterias con propiedades novedosas que permitan su inclusión en nuevos cultivos iniciadores, adjuntos e incluso probióticos para la industria láctea (Ayad *et al.*, 1999; Bozoudi *et al.*, 2015; Cogan *et al.*, 1997; Piraino *et al.*, 2008). Además, esto se considera una buena opción para mejorar los productos lácteos fermentados elaborados industrialmente, que con frecuencia se elaboran a partir de leche pasteurizada y cultivos iniciadores comerciales con características estándar y que, por ello, tienen características sensoriales poco destacables (Van Hoorde *et al.*, 2010).

La principal función de las BAL presentes en un cultivo iniciador para la elaboración de productos lácteos fermentados es producir grandes cantidades de ácido que provoquen la rápida acidificación de la leche y den lugar a cambios en la textura de la leche e inhiban el crecimiento de microorganismos alterantes (Beresford and William, 2003). Por lo tanto, los principales criterios de selección para cultivos iniciadores en la industria láctea son la rápida producción de ácido y una actividad proteolítica que permita un adecuado crecimiento en la leche (Cogan *et al.*, 1997; Settani and Moschetti, 2010). En general, las bacterias aisladas de leche humana en esta Tesis Doctoral tuvieron una baja producción de ácido. De hecho, no es frecuente encontrar una buena actividad acidificante entre los lactococos que se aíslan de productos lácteos artesanos (Cogan *et al.*, 1997). Sin embargo, la capacidad de producir ácido por parte de *S. salivarius* a 30°C fue comparable a la de *S. thermophilus*, por lo que este rasgo podría ser de interés para su inclusión en cultivos iniciadores.

Las BAL que tienen poca actividad acidificante y proteolítica pueden ser útiles como cultivos adjuntos para la industria láctea porque pueden promover la diferenciación, sobre todo en productos de corta maduración, debido a que una mayor actividad proteolítica puede potenciar el desarrollo del sabor y aroma del producto (Braghieri *et al.*, 2015; Crow *et al.*, 2001; Georgieva *et al.*, 2009). En general, las cepas de *S. salivarius* y *L. salivarius* son buenas candidatas como probióticos, pero no

se encuentran habitualmente en alimentos fermentados (Walter, 2008). La caracterización inicial de varias propiedades tecnológicas básicas en especies bacterianas que habitualmente no tienen relación con la industria láctea podría ser de interés para explorar su potencial para ser utilizadas en el desarrollo de nuevos alimentos funcionales o, alternativamente, descubrir novedosos cultivos iniciadores o adjuntos para la industria láctea. Este es el caso de algunas cepas de *S. salivarius* y *L. salivarius* aisladas de leche humana analizadas en esta Tesis Doctoral. Las actividades peptidásicas y esterásicas de cepas pertenecientes a ambas especies induce a estudiar su impacto como cultivos adjuntos para mejorar el sabor y aroma de productos lácteos fermentados.

5.2. *Lactobacillus gastricus*, un nuevo actor en la industria láctea

De la colección de bacterias aisladas de leche humana, las cepas de *L. gastricus* parecían especialmente atractivas al tratarse de una especie prácticamente desconocida hasta la fecha. Las cepas de *L. gastricus* estudiadas fueron muy poco acidificantes, aunque esto puede ser un rasgo deseable cuando se trata de cultivos adjuntos. Su actividad proteolítica fue comparable a la de algunas cepas probióticas que se añaden a queso y a la de lactococos y enterococos aislados de quesos artesanos (Delgado *et al.*, 2002; Ong *et al.*, 2007).

Por otra parte, la actividad metabólica de las BAL contribuye, además, al sabor, aroma, textura, valor nutritivo, propiedades bioactivas y seguridad microbiológica de los productos lácteos fermentados (Settani y Moschetti, 2010). Las cepas de *L. gastricus* analizadas, además de una actividad aminopeptidasa general, tenían una notable actividad frente a los dipéptidos de prolina (actividad XPDAP, del inglés *X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase*) necesaria para degradar las caseínas y los oligopéptidos ricos en prolina, que derivan de la acción de las proteinasas de la pared celular bacteriana sobre las caseínas y que son amargos. Los sustratos preferidos de las esterasas de las BAL son los derivados de los AG C4 y/o C6, en concordancia con lo obtenido en esta Tesis (Holland *et al.*, 2005). Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) tienen un umbral de percepción del olor relativamente alto (niveles de ppm) y son los responsables, especialmente el butírico, del olor típico a queso (Walstra y Jenness, 1984). Los bajos niveles de ésteres derivados de los AGCC, que tienen un umbral de percepción aún más bajo (niveles de ppb), también contribuyen positivamente al sabor del queso, aportando aromas frutales (Liu *et al.*, 2004).

La capacidad de controlar el crecimiento de microorganismos indeseables también es relevante en la fermentación de alimentos (Gálvez *et al.*, 2010). Las cepas de *L. gastricus* inhibieron el crecimiento de todos los microorganismos indicadores ensayados; este efecto probablemente esté relacionado con la producción de ácidos orgánicos (láctico y/ acético) ya que en esta Tesis Doctoral no se detectó la producción de otros compuestos antimicrobianos, como bacteriocinas o H₂O₂.

Las cepas de *L. gastricus* aisladas de leche humana sobrevivieron en presencia de sales biliares porcinas (hasta 0,5%) y tuvieron capacidad *in vitro* para adherirse al mucus. Por lo tanto, mostraron potencial para colonizar el tracto gastrointestinal (O'Sullivan *et al.*, 2005).

Con respecto a la resistencia a antibióticos, tres de las siete cepas de *L. gastricus* ensayadas mostraron unos valores de CMI superiores al punto de corte establecido para las bacterias heterofermentativas del género *Lactobacillus* para la kanamicina ($64 \mu\text{g mL}^{-1}$), la estreptomicina ($128 \mu\text{g mL}^{-1}$) y la eritromicina ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) (EFSA, 2012). La resistencia intrínseca a aminoglucósidos (como la kanamicina y la estreptomicina), debido a un fallo en el transporte, y a la vancomicina, relacionada con la estructura del péptidoglicano, es común en diferentes especies de lactobacilos (Elkins y Mullis, 2004; Gueimonde *et al.*, 2013). Ninguna de las cepas estudiadas tenía actividad β -glucuronidasa, ni capacidad para formar aminas biógenas.

La refrigeración, la congelación y la liofilización son las tecnologías de conservación más comunes que se aplican para la preparación industrial de concentrados bacterianos, ya sea para cultivos iniciadores, adjuntos, bioprotectores o probióticos. La capacidad de las cepas de *L. gastricus* para sobrevivir durante el almacenamiento a 8 y 3°C fue limitada, pero el almacenamiento en congelación a -20 o -80°C permitió conservar un alto grado de viabilidad celular durante un periodo de hasta 6 meses. El comportamiento de las preparaciones liofilizadas fue satisfactorio a pesar de que únicamente se empleó leche desnatada en polvo como crioprotector.

El origen singular de estas cepas, leche humana de individuos sanos, así como algunas de sus características biológicas, tecnológicas y funcionales les confieren un cierto atractivo para la industria láctea. La especie *L. gastricus* no está incluida en la lista de unidades taxonómicas recomendadas para la categorización QPS, pero esta lista no es cerrada (EFSA, 2009; 2012; EFSA BIOHAZ Panel, 2014). Aunque es necesario realizar estudios adicionales sobre *L. gastricus* PS3 para confirmar su potencial utilidad en la industria láctea, la disponibilidad de la secuencia genómica completa de la cepa *L. gastricus* PS3 permitirá profundizar en el conocimiento de sus propiedades tecnológicas y probióticas.

5.2. *L. fermentum* CECT 5716: acuerdo entre genoma y algunas propiedades fenotípicas

L. fermentum CECT5716 produce ácido láctico y acético, pero no se pudo detectar la producción de bacteriocinas o H_2O_2 ; de hecho, no se encontraron genes o grupos de genes implicados en la biosíntesis de sustancias antimicrobianas distintas a los ácidos orgánicos en su genoma. Por ello, la producción de tales ácidos y/o los procesos de exclusión competitiva podrían ser los implicados en la actividad antimicrobiana de esta cepa (Martín *et al.*, 2005a; Olivares *et al.*, 2006). *L. fermentum* CECT5716 mostró una actividad α -galactosidásica particularmente elevada, lo que

ofrece perspectivas interesantes para la aplicación de BAL como vectores para suministrar enzimas digestivas (LeBlanc *et al.*, 2008).

Esta Tesis Doctoral confirmó que *L. fermentum* CECT5716 puede producir glutatión, una propiedad no muy habitual entre los lactobacilos (Perán *et al.*, 2006). Esta capacidad está asociada con la presencia de genes implicados en la biosíntesis de este compuesto antioxidante. El glutatión participa activamente en los mecanismos antioxidantes de la mucosa intestinal, protegiéndola del daño inducido por los oxidantes. Varios estudios han señalado que las enfermedades inflamatorias intestinales se caracterizan por un menor contenido de glutatión y que la suplementación con este compuesto ejerce efectos beneficiosos en animales a los que se ha inducido colitis de forma experimental (Miralles-Barrachina *et al.*, 1999; Loguercio *et al.*, 2003).

Tradicionalmente, las BAL se han considerado consumidoras de las vitaminas del grupo B pero varios estudios han mostrado que algunas cepas tienen capacidad para sintetizar folato, riboflavina y/o cobalamina (Santos *et al.*, 2008; Jayashree *et al.*, 2011; Martín *et al.*, 2005b). *L. fermentum* CECT5716 produjo riboflavina y folato pero no cobalamina. Se desconoce la contribución de la microbiota a las necesidades de folato del epitelio intestinal, que se caracteriza por un elevado recambio celular, pero se ha descrito la existencia de un mecanismo para la absorción del folato luminal en enterocitos humanos (Dudeja *et al.*, 2001), lo cual sugiere que el folato producido *in situ* por la microbiota colónica podría ser utilizado por las células del epitelio intestinal.

Los valores CMI para distintos antibióticos fueron inferiores o iguales a los puntos de corte establecidos por la EFSA (2012), y se encuentran dentro de los rangos de susceptibilidad descritos por otros autores (Egervarn *et al.*, 2007). Se encontraron varias secuencias génicas potencialmente relacionadas probablemente con resistencia a antibióticos según el servidor RAST (<http://rast.nmpdr.org/>). Sin embargo, ninguno de estos genes se correlacionaba con un fenotipo claro de resistencia a antibióticos. En general, no se pudieron detectar genes transmisibles de resistencia a antibióticos en el genoma de *L. fermentum* CECT5716 y, por ello, esta cepa se puede considerar segura desde este punto de vista.

Globalmente, los resultados de este trabajo proporcionan evidencias sobre la relación existente entre las propiedades fenotípicas y el genoma de *L. fermentum* CECT5716. El análisis *in silico* es eficaz para predecir determinadas propiedades beneficiosas de esta bacteria puesto que todas las propiedades fenotípicas evaluadas se correlacionaron con la presencia de ciertos genes o grupos de genes. La genómica funcional abre nuevas vías para la selección de nuevas cepas probióticas y para investigar los mecanismos por los que estos microorganismos ejercen su efecto beneficioso en el huésped.

5.3. El queso como vehículo para administrar *L. salivarius* probióticos

El queso se ha considerado como una excelente alternativa a las leches fermentadas y los yogures para la administración de probióticos. Su capacidad tampón es una de sus ventajas porque protege a los probióticos frente al ambiente ácido del estómago. La estructura del gel y su elevado contenido de grasa y consistencia sólida también contribuye a la protección del probiótico (Cruz *et al.*, 2009; Ong *et al.*, 2006). Varios estudios han demostrado que el queso es un excelente vehículo para las bacterias probióticas (Vinderola *et al.*, 2000; Ong *et al.*, 2007). Pero, dado que se han obtenido resultados variables con las diferentes cepas probióticas, en esta Tesis se han analizado dos cepas de *L. salivarius* individualmente.

En teoría las bacterias probióticas se podrían añadir directamente a la leche y/o ser incorporadas en una etapa más tardía de la elaboración del queso, porque podría haber cierta pérdida de los probióticos en el suero (Ong *et al.*, 2006). En ensayos preliminares realizados durante esta Tesis, las cepas de *L. salivarius* (CECT 5713 y PS2) se añadieron al mismo tiempo que el cultivo iniciador pero la cantidad de probiótico retenida en la cuajada fue muy pequeña, produciéndose una elevada pérdida en el suero (resultados no mostrados). La adición de los lactobacilos a los granos de cuajada, después de eliminar el suero y antes de moldear tuvo como resultado una elevada retención de las cepas en el queso. Para que se pueda llegar a una aplicación industrial el probiótico incorporado a un alimento debe mantener su viabilidad durante la elaboración y vida útil del producto. En esta Tesis, ambas cepas de *L. salivarius* permanecieron viable en los quesos experimentales después de 28 días a 4°C, teniendo el producto final una calidad higiénica adecuada. La actividad antibacteriana de *L. salivarius* CECT 5713 se ha atribuido a la producción de compuestos como los ácidos láctico y acético y el peróxido de hidrógeno (Martín *et al.*, 2006).

La dosis mínima de probiótico que se requiere para ejercer un efecto beneficioso en el consumidor es de 10^8 – 10^9 ufc (Cruz *et al.*, 2009; Talwalkar *et al.*, 2004). Esto sería equivalente a una ingesta diaria de 100 g de un producto que contenga 10^6 – 10^7 ufc/g. Los resultados obtenidos en esta Tesis muestran que el recuento de *L. salivarius* CECT 5713 y *L. salivarius* PS2 siempre estuvo en el rango de este nivel recomendado en los quesos resultantes. Por lo tanto, satisfacerían este criterio. Además, la presencia de estas bacterias no interfirió con el desarrollo del lactococo utilizado como cultivo iniciador, de acuerdo con lo descrito por otros autores, y tampoco produjo un cambio sustancial en la composición del queso fresco (Ong *et al.*, 2007).

La evaluación de la textura del queso con métodos instrumentales solo permitió detectar diferencias en la dureza pero dicha diferencia no fue percibida por los jueces durante el análisis descriptivo. Esto indica que la adición de *L. salivarius* CECT 5713 o *L. salivarius* PS2 no tuvo un impacto relevante en la calidad sensorial y aceptación del queso. El principal cambio que se detectó en los compuestos volátiles fue una

mayor concentración de ácido acético en los quesos que contenían las cepas de *L. salivarius*, probablemente como consecuencia de una mayor degradación de la lactosa durante el almacenamiento del queso. Estas diferencias no modificaron la percepción sensorial que tuvieron los jueces ni la aceptación global de los quesos elaborados con *L. salivarius* CECT 5713 y *L. salivarius* PS2, de forma similar a lo que se ha descrito con otras cepas probióticas (Ong *et al.*, 2006; Buriti *et al.*, 2005).

5.4 Potencial de *E. faecium* LJx4, una cepa aislada de leche humana, para la industria láctea

La práctica industrial actual persigue un control férreo sobre las fermentaciones para lograr productos fermentados uniformes y de manera consistente. Estos productos a menudo se describen como poco atractivos y con propiedades organolépticas poco pronunciadas. En este contexto, sería deseable encontrar nuevas cepas para aumentar la biodiversidad, así como para diversificar y desarrollar características distintivas y/o deseables en los alimentos fermentados (Cogan *et al.*, 2007; Peláez y Requena, 2005). Se considera que un amplio número de cepas de enterococos poseen propiedades tecnológicas y probióticas deseables, incluyendo la producción de bacteriocinas (Cogan *et al.*, 2007; Foulquié Moreno *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 2011; Peláez y Requena, 2005).

E. faecium LJx4, una cepa aislada de leche humana, no se puede considerar como una cepa muy acidificante ni muy proteolítica, rasgos que suelen encontrarse entre las BAL que no forman parte de los cultivos iniciadores comerciales empleados en la industria láctea (Ayad *et al.*, 2000; Psoni *et al.*, 2006). Sin embargo, cada vez hay mayor interés en buscar y seleccionar cepas que contribuyan a aumentar el sabor y olor del queso, lo cual está ligado a la ruptura enzimática de la proteína y la grasa de la leche. Y, precisamente, los enterococos juegan un papel clave en la maduración y desarrollo del sabor y aroma en muchos quesos del sur de Europa (Franz *et al.*, 2003; Foulquié Moreno *et al.*, 2006).

Se ha sugerido que la búsqueda de cepas bacterianas en nichos naturales y su combinación con cepas industriales, si fuera necesario, es una alternativa interesante para el desarrollo de cultivos iniciadores “a medida” ya que producen componentes y/o perfiles aromáticos y sápidos poco habituales (Smit *et al.*, 2005). En este sentido, el queso elaborado con *E. faecium* LJx4 tenía una mayor concentración de acetoína y de etanol, lo cual podría aportar al queso notas aromáticas a mantequilla, alcohólicas y florales (Molimard y Spinnler, 1996).

E. faecium LJx4 demostró tener actividad anti-*Listeria in vitro*, aunque no se pudo demostrar que fuera debido a la producción de bacteriocinas. *E. faecium* LJx4 controló la población inoculada de *L. innocua* SA1 en dos modelos lácteos de leche fermentada y queso, pero no tan eficientemente como *Lc. lactis* 153, una cepa que alcanzó un recuento más elevado y valores más bajos de pH en el producto y produjo

una mayor cantidad de ácido acético. Globalmente, los resultados obtenidos en esta Tesis sugieren que *E. faecium* LJx4 ejerce una acción bacteriostática frente a *L. innocua* SA1, lo cual podría ser efectivo para el control de *Listeria* si se combinara con otras barreras tecnológicas. De hecho, los consorcios microbianos complejos en queso tienen un efecto bacteriostático mayor frente a *L. monocytogenes* que un cultivo iniciador aislado, aunque se desconoce con exactitud el mecanismo exacto de esta actividad anti-*Listeria* (Callon *et al.*, 2014).

XII.6 CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en esta Tesis Doctoral son las siguientes:

Primera. La evaluación de las propiedades tecnológicas de una colección de 35 cepas aisladas de leche humana, y que incluía bacterias de los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium*, mostró que aquellas pertenecientes a las especies *Streptococcus salivarius* y *Enterococcus faecalis* poseían la mayor actividad acidificante. Las cepas de *Enterococcus faecalis* fueron las más proteolíticas, mientras que las de *Streptococcus salivarius* y *Lactobacillus salivarius* mostraron actividades aminopeptidásicas y esterásicas elevadas.

Segunda. Las cepas de *Lactobacillus gastricus* caracterizadas en esta Tesis Doctoral presentaron propiedades atractivas para ser empleadas en la elaboración de productos lácteos.

Tercera. La secuenciación y anotación del genoma de *Lactobacillus gastricus* PS3 confirma su potencial para su aplicación en la elaboración de productos lácteos.

Cuarta. Existe una buena correlación entre las propiedades fenotípicas relacionadas con la funcionalidad y la seguridad de *Lactobacillus fermentum* CECT5716 y la información genética contenida en su genoma.

Quinta. *Lactobacillus salivarius* CECT 5713 y *L. salivarius* PS2, dos cepas probióticas aisladas de leche humana, sobrevivieron durante la producción y el almacenamiento de quesos frescos durante 28 días a 4°C, no interfirieron con el cultivo iniciador y no modificaron significativamente la composición, las características organolépticas y la aceptación global de los quesos probióticos. En consecuencia, los quesos frescos pueden ser un buen vehículo para la administración de ambas cepas.

Sexta. *Enterococcus faecium* LJx4, una cepa segura aislada de leche humana, podría ser útil como cultivo adjunto y/o bioprotector en la industria láctea porque tiene escasa actividad acidificante y proteolítica, cambia la composición de compuestos volátiles del queso y tiene actividad anti-*Listeria* tanto *in vitro* como en dicho alimento.

XII.7 REFERENCIAS

Aureli, P., Capurso, L., Castellazzi, A.M., Clerici, M., Giovannini, M., Morelli, L., Poli, A., Pregliasco, F., Salvini, F., Zuccotti, G.V. 2011. Probiotics and health: an evidence-based review. *Pharmacological Research: The Official Journal of The Italian Pharmacological Society*. 63: 366-376.

Abeijón Mukdsi, M., Medina, R., Katz, M., Pivotto, R., Gati, P., González, S.N. 2009. Contribution of lactic acid bacteria esterases to the release of fatty acids in miniature ewe's milk cheese models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 1036-1044.

Ayad, E.H.E., Verheul, A., Wouters, J.T.M., Smit, G. 2000. Application of wild starter cultures for flavour development in pilot plant cheese making. *International Dairy Journal*. 10: 169-179.

Beresford, T., Williams, A. 2004. The microbiology of cheese ripening. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (eds.). Academic Press.1: 287-317.

Bover-Cid, S., Holzapfel, W.H. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*. 53: 33-41.

Buriti, F.C.A., Da Rocha, J.S., Saad, S.M.I. 2005. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *International Dairy Journal*. 15: 1279-1288.

Callon, C., Retureau, E., Didienne, R., Montel, M.C. 2014. Microbial biodiversity in cheese consortia and comparative *Listeria* growth on surfaces of uncooked pressed cheeses. *International Journal of Food Microbiology*. 174: 98-109.

Carr, F.J., Chill, D., Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28: 281-370.

Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H., Catignani, G.L. 1983. Spectrophotometric assay using *o*-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*. 66: 1219-1227.

Cohen, P.S., Laux, D.C. 1995. [24] Bacterial adhesion to and penetration of intestinal mucus in vitro. *Methods in enzymology*. 253: 309-314.

Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P.S., Fernandes, I., Gomez, J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Antonio Ledda, A., Medina, M., Rea, M.C., Rodriguez, E. 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*. 64: 409-421.

Cogan, T.M., Beresford, T.P., Steele, J., Broadbent, J., Shah, N.P., Ustunol, Z. 2007. Invited Review: Advances in starter cultures and cultured foods. *Journal of Dairy Science*. 90: 4005-4021.

Cruz, A., Buriti, F.C., Souza, C. H., Faria, J.A., Saad, S.M. 2009. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science and Technology*. 20: 344-354.

Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H., Catignani, G.L. 1983. Spectrophotometric assay using *o*-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*. 66: 1219-1227.

Delgado, S., Delgado, T., Mayo, B. 2002. Technological performance in milk of several lactococci and enterococci strains of dairy origin. *Journal of Food Protection*. 65: 1590-1596.

Doyle, M.P., Steenson, L.R., Meng, J. 2013. Bacteria in food and beverage production. Chapter 8. In *The Prokaryotes-Applied Bacteriology and Biotechnology*. Rosenberg et al. (eds.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 241-256.

Douillard, F.P., de Vos, W.M. 2014. Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. *Microbial Cell Factories*.13: 1-21.

Dudeja, P.K., Kode, A., Alnounou, M., Tyagi, S., Torania S., Subramanian V.S., Said H.M. 2001. Mechanism of folate transport across the human colonic basolateral membrane. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 281: G54-G60.

EFSA. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). 2009. Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed (2009 update). *EFSA Journal*. 7: 1431.

EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), 2014. Statement on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 1: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until October 2014. *EFSA Journal* 2014;12(12):3938.

EFSA. 2012. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*.10: 2740

Egervarn, M., Danielsen, M., Roos, S., Lindmark, H., Lindgren, S. 2007. Antibiotic susceptibility profiles of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Food Protection*. 70: 412-418.

Elsser-Gravesen, D., Elsser-Gravesen, A. 2014. Biopreservatives. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*. 143: 29-49.

Elkins, C.A., Mullis, L.B. 2004. Bile-mediated aminoglycoside sensitivity in *Lactobacillus* species likely results from increased membrane permeability attributable to cholic acid. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 7200-7209

Fellis, G.E., Dellaglio, F. 2007. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. 8: 44-61.

FAO/WHO, "Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria," Technical Report, FAO/WHO, Geneva, Switzerland, 2001.

Fernandez, L., Langa, S., Martin, V., Maldonado, A., Jimenez, E., Martin, R., Rodríguez, J.M. 2013. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*. 69:1-10.

Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Muñoz-Quesada, S., Gil, A. 2013. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*. 109: S35-S50.

Foulquié Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. 106: 1-24.

Franz, C.M., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapfel, W.H. 2003. Enterococci in foods: a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 88: 105-122.

Franz, C. M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., Gálvez, A. 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 151: 25-140.

Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L., Ben Omar, N. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*. 120: 51-70.

Gálvez, A., Abriouel, H., Benomar, N., Lucas, R. 2010. Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. *Current Opinion in Biotechnology*. 21: 142-148.

Grimaldi, A., Bartowsky, E., Jiranek, V. 2005. Screening of *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. for glycosidase activities that are important in oenology. *Journal of Applied Microbiology*. 99: 1061-1069.

Gueimonde, M., Sánchez, B., Clara, G., Margolles, A. 2013. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 4: 202

Heikkilä, M.P., Saris, P.E.J. 2003. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *Journal of Applied Microbiology*. 95: 471-478.

Heilig, H.G., Zoetendal, E.G., Vaughan, E.E., Marteau, P., Akkermans, A.D.L., de Vos, W.M. 2002. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 114-123.

Holland, R., Liu S.-Q., Crow, V.L., Delabre, M.-L., Lubbers, M., Bennett, M., Norris, G. 2005. Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. *International Dairy Journal*. 15: 711-718.

Jayashree, S., Rajendhran, J., Jayaraman, K., Kalaichelvan, G., Gunasekaran, P. 2011 Improvement of riboflavin production by *Lactobacillus fermentum* isolated from yogurt. *Food Biotechnology*. 25: 240-251.

Jiménez, E., Fernández, L., Maldonado, A., Martín, R., Olivares, M., Xaus, J., Rodríguez, J.M. 2008. Oral administration of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 4650-4655.

Jiménez, E., Langa, S., Martín, V., Arroyo, R., Martín, R., Fernández, L., Rodríguez, J.M. 2010. Complete genome sequence of *Lactobacillus fermentum* CECT 5716, a probiotic strain isolated from human milk. *Journal of Bacteriology*. 192: 4800-4800.

LeBlanc, J.G., Ledue-Clier, F., Bensaada, M., de Giori, G.S., Guerekobaya, T., Sesma, F., Juillard, V., Rabot S., Piard, J.C. 2008. Ability of *Lactobacillus fermentum* to overcome host alpha-galactosidase deficiency, as evidenced by reduction of hydrogen excretion in rats consuming soya alpha-galactooligosaccharides. *BMC Microbiology*. 8: 22.

Lee, J.H., Diono, R., Kim, G.Y., Min, D.B. 2003. Optimization of solid phase microextraction analysis for the headspace volatile compounds of Parmesan cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 1136-1140.

Leroy, F., de Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*. 15: 67-78.

Liu, S.Q., Holland, R., Crow, V.L. 2004. Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. *International Dairy Journal*. 14: 923-945.

Loguercio, C., D'Argenio, G., Delle Cave, M., Cosenza, V., Della Valle, N., Mazzacca, G., Blanco, C.D.V. 2003. Glutathione supplementation improves oxidative damage in experimental colitis. *Digestive and Liver Disease*. 35: 635-641.

Magnusson, J., Schnürer, J. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 1-5.

Marín, M.L., Arroyo, R., Jiménez, E., Gómez, A., Fernández, L., Rodríguez, J.M. 2009. Cold Storage of human milk: effect on its bacterial composition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 49: 343-348.

Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M.L., Xaus, J., Fernández, L., Rodríguez, J.M. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of Pediatrics*. 143: 754-758.

Martín, R., Olivares, M., Marín, M.L., Fernández, L., Xaus, J., Rodríguez, J.M. 2005a. Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. *Journal of Human Lactation*. 21: 8-17.

Martín, R., Olivares, M., Marín, M.L., Xaus, J., Fernández, L., Rodríguez, J.M. 2005b. Characterization of a reuterin-producing *Lactobacillus coryniformis* strain isolated from a goat's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 104: 267-277.

Martín, R., Jiménez, E., Olivares, M., Marín, M.L., Fernández, L., Xaus, J., Rodríguez, J.M. 2006. *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. *International Journal of Food Microbiology*. 112: 35-43.

Martín, R., Heilig, G.H.J., Zoetendal, E.G., Smidt, H., Rodríguez, J.M. 2007. Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *Journal of Applied Microbiology*. 103: 2638-2644.

Martín, R., Jiménez, E., Heilig, H., Fernández, L., Marín, M.L., Zoetendal, E.G., Rodríguez, J.M. 2009. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 75: 965-969.

Martín, V. 2011. Interacciones entre la microbiota de la leche humana y el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1). PhD dissertation. Universidad Complutense de Madrid.

Martín, V., Maldonado-Barragán, A., Moles, L., Rodríguez-Baños, M., Campo, R.D., Fernández, L., Rodríguez, J.M., Jiménez, E. 2012. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *Journal of Human Lactation*. 28: 36-44.

Miralles-Barrachina, O., Savoye, G., Belmonte-Zalar, L., Hochain, P., Ducrotte, P., Hecketsweiler, B., Lerebours, E., Dechelotte, P. 1999. Low levels of glutathione in endoscopic biopsies of patients with Crohn's colitis: the role of malnutrition. *Clinical Nutrition*. 18:313-317.

Moles, L., Gómez, M., Heilig, H., Bustos, G., Fuentes, S., de Vos, W., Fernández, L., Rodríguez, J.M., Jiménez, E. 2013. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PLoS One*. 8: Article ID e66986.

Molimard, P., Spinnler, H.E. 1996. Review: Compounds involved in the flavour of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. *Journal of Dairy Science*. 79: 169-184.

Moll, G.N., Konings, W.N., Driessen, A.J.M. 1999. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76: 185-198.

Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaird, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W., Backhaus, H. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*. 178: 5636-5643.

Olivares, M., Díaz-Ropero, M.P., Martín, R., Rodríguez, J.M., Xaus, J. 2006. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *Journal of Applied Microbiology*. 101:72-79.

Ong, L., Henriksson, A., Shah, N.P. 2006. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *International Dairy Journal*. 16: 446-456.

Ong, L., Henriksson, A., Shah, N.P. 2007. Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* and *Bifidobacterium* sp. *International Dairy Journal*. 17: 67-78.

O'Sullivan, G.C., Kelly, P., O'Halloran, S., Collins, C., Collins, J.K., Dunne, C., Shanahan, F. 2005. Probiotics: an emerging therapy. *Current Pharmaceutical Design*. 11: 3-10.

Peláez, C., Requena, T. 2005. Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. *International Dairy Journal*. 15: 831-844.

Peran, L., Camuesco, D., Comalada, M., Nieto, A., Concha, A., Adrio, J.L., Olivares, M., Xaus, J., Zarzuelo, A., Galvez, J. 2006. *Lactobacillus fermentum*, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis. *International Journal of Colorectal Disease*. 21: 737-746.

Psoni, L., Kotzamanides, C., Andrighetto, C., Lombardi, A., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. 2006. Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Enterococcus* isolates from Batzos, a raw goat milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 109:109-120.

Reginensi, S.M., González, M.J., Bermúdez, J. 2013. Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from cow, ewe and goat dairy artisanal farmhouses. *Brazilian Journal of Microbiology*. 44: 427-430.

Reviriego, C., Eaton, T., Martín, R., Jiménez, E., Fernández, L., Gasson, M.J., Rodríguez, J.M. 2005. Screening of virulence determinants in *Enterococcus faecium* isolated from breast milk. *Journal of Human Lactation*. 21: 131-137.

Ruiz-Barba, J.L., Maldonado, A., Jiménez-Díaz, R. 2005. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Analytical Biochemistry*. 347: 333-335.

Santos, F., Vera, J.L., van der Heijden, R., Valdez, G., de Vos, W.M., Sesma, F., Hugenholtz, J. 2008. The complete coenzyme B12 biosynthesis gene cluster of *Lactobacillus reuteri* CRL1098. *Microbiology*. 154: 81-93.

Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M.D., Rea, M.C., Lombardi, A., Cogan, T.M., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal*. 11: 621-647.

Settanni, L., Moschetti, G. 2010. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits, *Food Microbiology*. 27: 691-697.

Shiby, V.K., Mishra, H.N. 2013. Fermented milks and milk products as functional foods-a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 53: 482-96.

Smit, G., Smit, B.A., Engels, W.J.M. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*. 29: 591-610.

Song, Y-L., Kato, N., Matsumiya, Y., Liu, C-X., Kato, H., Watanabe, K. 1999. Identification of and hydrogen peroxide production by fecal and vaginal lactobacilli isolated from Japanese women and newborn infants. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 3062-3064.

Stiles, M.E., Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. 36: 1-29.

Talwalkar, A., Miller, C.W., Kailasapathy, K., Nguyen, M.H. 2004. Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*. 39: 605-611.

Vinderola, C.G., Prosello, W., Ghiberto, D., Reinheimer, J.A. 2000. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. *Journal of Dairy Science*. 83: 1905-1911.

Walstra, P., Jenness, R. 1984. *Dairy chemistry and physics*. New York: Willey, (Chapter 18).

Yap, P.S., Gilliland, S.E. 2000. Comparison of newly isolated strains of *Lactobacillus delbrueckii* susp. *lactis* for hydrogen peroxide production at 5°C. *Journal of Dairy Science*. 83: 628-632.

XIII. EXTENDED ABSTRACT²

²This extended abstract is included in fulfilment of the directives of the regulation of development of the Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, which regulates the studies of doctorate at the Universidad Complutense de Madrid (UCM) (BOUC nº14, de 21 de diciembre de 2012) and in agreement with the specifications established by the Commission of Doctorate of the UCM.

XIII. 1 INTRODUCTION

Lactic acid bacteria (LAB) comprise a heterogeneous group of Gram-positive, catalase-negative, aerotolerant, non-spore-forming, non-motile, and acid tolerant bacteria which produce lactic acid as the major end product after carbohydrate metabolism (Fellis and Dellaglio, 2007). This group includes many different genera, although scientific and commercial interests rely on those belonging to the families *Lactobacillaceae* (*Lactobacillus* and *Pediococcus*), *Leuconostocaceae* (*Oenococcus* and *Leuconostoc*), *Enterococcaceae* (*Enterococcus*), and *Streptococcaceae* (*Lactococcus* and *Streptococcus*) (Stiles and Holzappel, 1997; Doyle *et al.*, 2013). LAB have adapted to and are found in many nutrient-rich environments, ranging from food (milk, meat, cereals) to mucosal surfaces (oral cavity, gastrointestinal tract, vagina) of several animal species (Douillard and de Vos, 2014).

Bifidobacteria are Gram-positive, anaerobic (although some microaerophilic species exist), non-spore-forming, non-motile and often branched bacteria that are not phylogenetically related to LAB. Bifidobacteria also produce lactic acid but always in combination with acetic acid, after carbohydrate fermentation using the fructose-6-phosphate pathway. Bifidobacteria are mainly associated with the oral cavity, gastrointestinal tract and vagina of mammals (Fellis and Dellaglio, 2007).

LAB have a great economic importance because they are the most frequently used bacteria in both artisan and industrial food fermentations, mainly in the production of dairy products (yoghurt, cheese, butter, sour milk, buttermilk, kefir...). The fast production of organic acids, the consumption of nutrients in milk and/or the production of different antimicrobial compounds, such as bacteriocins, have a preservative effect by controlling the growth of spoilage microorganisms (Carr *et al.*, 2002; Moll *et al.*, 1999). In fact LAB are being exploited as biocontrol agents; their Qualified Presumption of Safety (QPS) status in the EU and their Generally Recognized as Safe (GRAS) status in the USA make them an attractive alternative to traditional food preservatives (Gálvez *et al.*, 2007; Elsser-Gravesen and Elsser-Gravesen, 2014).

LAB used as starter and/or adjunct cultures also contribute to flavor, aroma and texture development in the final product (Leroy and de Vuyst, 2004; Reginensi *et al.*, 2013). Therefore many of their technological properties are important criteria for the selection of new cultures including, among others, lactose metabolism, proteinase, peptidase and esterase activities, production of volatiles compounds, resistance to bacteriophages and production of inhibitory compounds (Doyle *et al.*, 2013). In fact, the control over the activities of LAB peptidases is a key target in cheese ripening technology (Beresford, 2004).

In addition, LAB and bifidobacterial strains have been associated for decades with health benefits linked to the consumption of fermented milk products and some strains are well known for their probiotic characteristics (Aureli *et al.*, 2011). Probiotics

are defined as “live microorganisms which administered in adequate amounts confer a health benefit on the host” (FAO/WHO, 2001). These microorganisms are the most frequently used in the manufacture of probiotic foods, mainly by the dairy industry (Shiby and Mishra, 2013).

Several studies have confirmed that human milk is an excellent source of LAB and bifidobacteria, including strains of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium adolescentis* and *Bifidobacterium bifidum* (Heikkilä and Saris, 2003; Jiménez *et al.*, 2008; Martín *et al.*, 2007; Martín *et al.*, 2009). The origin of these microorganisms is particularly attractive for their use in dairy industry; in fact, human milk has been regarded as an important source for selection of probiotic bacteria (Martín *et al.*, 2005a; Fontana *et al.*, 2013).

In this context, the objective of this PhD Thesis was to study several technological properties (acidifying capacity, proteolytic, peptidase and esterase activity) in a collection of LAB and bifidobacteria isolated from human milk of healthy women.

XIII.2 OBJECTIVES

Accordingly, the objectives of this PhD Thesis were:

1. To assess some technological properties of interest for dairy industry in a collection of bacteria isolated from human milk, and to compare them with those of lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from other sources.

2. To study technological and potentially probiotic properties in a collection of *L. gastricus* strains previously isolated from human milk of healthy women and intended to be used in dairy products.

3. To perform the whole-genome sequencing of *L. gastricus* PS3 in order to obtain its draft genome sequence. This will allow to get insight into its biology and to characterize genes that could provide advantageous technological and probiotic properties.

3. To evaluate the relationship between the genetic background of *L. fermentum* CECT 5716 and certain phenotypic characteristics, including antimicrobial production, biosynthesis of B group vitamin and glutathione, glycosidase activities, the presence of phages, and the occurrence of antibiotic resistance genes.

4. To determine the performance of *L. salivarius* CECT 5713 and *L. salivarius* PS2, two strains isolated from human milk in order to develop a probiotic cheese.

5. To analyze some traits of technological relevance of *E. faecium* LJx4, a strain also isolated from human milk, in order to evaluate its potential application as starter and/or adjunct culture in fermented dairy products.

XIII.3 MATERIAL AND METHODS

A collection of bacterial strains previously isolated from human milk of healthy women were used in this PhD Thesis (Martín *et al.*, 2003; Martín *et al.*, 2011; Martín *et al.*, 2012; Marín *et al.*, 2009; Reviriego *et al.*, 2005). They were routinely cultured in De Man, Rogosa and Sharpe (MRS, Oxoid, Basinstoke, UK) broth, supplemented when indicated with 0.25% (wt/vol) L-cysteine (MRS-C), at 37°C in aerobic or anaerobic conditions (85% N₂, 10% H₂, and 5% CO₂). MRS-Cys was prepared from the ingredients replacing glucose by an equivalent amount of cellobiose, lactose, maltose, or raffinose, when required. Eventually, bacterial strains were cultured in heat-treated (121°C, 5 min) reconstituted 10% (wt/vol) skimmed milk (HT-RSM). Viable bacteria counts were determined by plating adequate dilutions of cultures on agar plates.

Carbohydrate fermentation and enzymatic activity profiles were determined by using the API 50 CH system and the API Zym galleries (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France), respectively, according to the manufacturer's instructions.

The acidifying activity of the strains was determined in HT-RSM after inoculation (1%, v/v) with a MRS or MRS-C broth culture of the corresponding strain. The pH and acidifying activity were measured after incubation for 6, 12 and 24 h at 30°C in aerobiosis. The titratable acidity of HT-RSM cultures was determined by titration with 0.11 M NaOH in the presence of phenolphthalein and was expressed as the amount of lactic acid produced (g/100 mL of milk).

Proteolytic activity was determined by the OPA (*o*-phthaldehyde) spectrophotometric assay in HT-RSM as described by Church *et al.* (1983). The results were expressed as the increase in OD₃₄₀ over the uninoculated control.

Peptidase, esterase and glycosidase activities were determined in cell-free extracts (CFE) after adapting the methods to a multiwell plate format. Protein content of the CFEs was determined using a commercial reagent (Bio-Rad Laboratories, Madrid, Spain) based on Bradford dye-binding assay with bovine serum albumin as standard. Aminopeptidase activities were investigated using *p*-nitroanilide derivatives of alanine, leucine, lysine, proline and glycyl-proline (Ala-*p*NA, Leu-*p*NA, Lys-*p*NA, Pro-*p*NA, and Gly-Pro-*p*NA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) following the method described by Sarantinopoulos *et al.* (2001). Esterase activities were determined using the method described by Abeijón *et al.* (2009) using α -naphthyl (α NA) derivatives of acetate, propionate, butyrate, and caproate (α NA-C₂, α NA-C₃, α NA-C₄, and α NA-C₆) (Sigma). Glycosidase activities were assayed according to the method described by Grimaldi *et al.* (2005), using *p*-nitrophenyl (*p*NP)-derivatives of α -D-glucopyranoside, β -D-glucopyranoside, α -D-galactopyranoside, and β -D-galactopyranoside (*p*NP- α Glu, *p*NP- β Glu, *p*NP- α Gal, and *p*NP- β Gal) (Sigma). Specific enzymatic activity was expressed as the amount of hydrolyzed per mg of protein in CFE and minute or hour.

L-lactic acid, D-lactic acid and acetic acid production was determined in culture supernatants using enzymatic kits (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) following the manufacturer's instructions.

To evaluate the production of antimicrobial compounds, an overlay method described by Magnusson and Schnürer (2001) was used, measuring for each indicator microorganism the inhibition zone diameters around the streaks of the tested strain. Bacteriocin activity was measured by an agar well diffusion method as described by Martín *et al.* (2006). Hydrogen peroxide production was tested following the procedures described by Song *et al.* (1999) and Yap and Gilliland (2000).

The acid tolerance was determined in broth media adjusted to pH 6, 4 or 2 with HCl. After inoculation with a fully-grown culture (1%, v/v), the mixtures were incubated at 37°C for 2 h. The survival in the presence of bile salts was determined in broth and HT-RSM supplemented with 0.1, 0.2, or 0.5% (wt/vol) porcine bile salts (Sigma). Viable cells were determined before and after incubation by plate counting.

The adhesion to mucin was determined according to the method described by Cohen and Laux (1995) using porcine mucin (Sigma) immobilized in polystyrene microtiter plate wells (Maxisorp; Nunc, Roskilde, Denmark) and bacteria labelled with carboxyfluorescein (Sigma). Fluorescence associated with the plates after washing to remove unattached cells was measured in a fluorescence microplate reader (Tecan Austria GMBH, Salzburg, Austria).

The ability to produce biogenic amines was evaluated on MRS agar plates prepared from the different components and adding an amino acid precursor (tyrosine, histidine, ornithine, or lysine) and a pH indicator as described before (Bover-Cid and Holzapfel, 1999).

Minimum inhibitory concentrations (MICs) of antimicrobial agents were determined by a microdilution method using microtiter VetMIC plates for LAB (National Veterinary Institute of Sweden, Uppsala, Sweden). The MIC was defined as the lowest concentration at which no growth was observed after incubation at 37°C for 48 h. MICs values were compared with the microbiological cut-off values established by the European Food Safety Authority (EFSA, 2012).

To test the bacterial stability during different storage conditions, cells were harvested from stationary phase cultures and washed twice with phosphate buffered saline and suspended in 10 % wt/vol HT-RSM at a cell concentration of 10^9 - 10^{10} colony forming units (cfu) mL⁻¹. Bacterial suspensions were refrigerated and stored at 3 and 8°C for up to 28 days, frozen and stored at -20°C and -80°C for up to 6 months, or freeze dried and stored at 3°C and 25°C for up to 6 months. Viable bacteria were determined regularly by plate counting.

Whole-genome sequencing of *L. gastricus* PS3 was performed by pyrosequencing on a GS-FLX sequencer to 19.14-fold coverage (454 Life Sciences, Brandford, CT, USA). The initial draft assembly to generate contigs was done using

the Newbler program version 2.3 (Roche Applied Sciences). Coding regions were predicted using the BG7 system (Era7 Technologies, Granada, Spain).

Experimental cheeses were made from commercial pasteurized (high temperature short time, HTST) cow's milk (Ganadería Priégola SA, Villanueva del Pardillo, Madrid, Spain) following a laboratory-scale procedure. *Lc. lactis* ESI 153 (Cogan *et al.*, 1997, approximately $9 \log_{10}$ cfu/mL) was used as starter culture, and rennet (Fromase, 44 IMCU/L; DSM Food Specialities, Seclin Cedex, France) was added to milk 30 min after the inoculation of *Lc. lactis* ESI 153. Curds were cut 40 min after rennet addition and heated at 38°C for 40 min. Whey was drained off and, when required, freeze dried *L. salivarius* CECT 5713 or *L. salivarius* PS2 were added to the curd, to reach a final concentration of $\sim 8 \log_{10}$ cfu/g before molding. Cheeses were pressed for 16 h at room temperature and salted in 15 % brine (wt/vol) during 3 h. The resulting cheeses (~ 190 g) were cut into pieces, which were individually vacuum-packed in Cryovac plastic bags and kept refrigerated at 4°C during 28 days. Cheese samples were analyzed for pH, water activity (a_w), moisture, fat, protein, and ash content.

Viability of the *L. salivarius* strains was monitored in cheese samples by plating on MRS agar plates containing 0.002% (wt/vol) of bromophenol blue after 24 h at 37°C, while *Lc. lactis* ESI 153 was enumerated on M17 (Oxoid) agar plates supplemented with 0.5% (wt/vol) glucose (GM17) after 24 h at 32°C. To confirm their identity, selected colonies were observed by optical microscopy to check their morphology and Gram staining and typed by Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) using primer OPL5 (5'-ACG CAG GCA C-3') (Ruíz-Barba *et al.*, 2005). Ten randomly chosen isolates sharing the same RAPD profile were subjected to Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) following the procedure described by Martín *et al.* (2012).

Isolation of total bacterial DNA from cheese samples was done following the protocol described previously by Moles *et al.* (2013), after homogenization into sodium citrate using a stomacher. Primers U968-GC-f (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC-3') and L1401-r (5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3') (Nübel *et al.*, 1996) and Lab159f (5'-GGA AAC AGG TGC TAA TAC CG-3') and Uni-515-GCr (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAT CGT ATT ACC GCG CTG CTG GCA C-3') (Heilig *et al.*, 2002) were used to amplify V6-V8 regions from 16S rRNA genes on bacterial DNA. The amplification program was as follows: 95°C for 2 min, 35 cycles of 95°C for 30 s, 56°C for 40 s, 72°C for 60 s, and then 72°C for 5 min, and PCR fragments were separated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) using a DCode System (BioRad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA) and gels with a linear denaturant gradient of 30 to 50% as described by Martín *et al.* (2009).

Texture profile analysis (TPA) of the cheeses was performed in a texturometer TA-XT2i (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK) provided with a 0.2 N load cell and a 20 mm diameter probe at a crosshead speed of 5 mm/s to perform a uniaxial compression test in two consecutive compressions. Cheese samples (2 cm³) were placed between the two parallel plates and compressed to 50% of its original height sample. TPA parameters (hardness, cohesiveness, adhesiveness, chewiness, gumminess, and springiness) were determined from the TPA two-compression force-time curve with the aid of the Texture Expert for Windows software, version 1.20 (Stable Micro Systems).

The colour of cheese samples (surface and interior) was determined with a tristimulus colour analyzer (Minolta Chroma Meter CR300, Minolta Corporation, Ramsey, New Jersey, USA), and the results were expressed using the CIE *L*a*b* (CIELAB) Space.

Volatile compounds were extracted from cheese samples by headspace solid-phase microextraction (SPME) and, then, analysed by gas chromatography-mass spectrometry GC-MS (HP6890-MSD HP 5973, Agilent, Palo Alto, CA, USA) according to the procedure described by Lee *et al.* (2003). Identification of volatile compounds was based on comparison of spectra using the Wiley 275 Library (Wiley and Sons Inc., New York, USA). Relative abundances of compounds were expressed as percentages of their peak areas to the cyclohexanone peak area.

The sensory evaluation of cheeses was done by staff and students of the Department of Food Science and Technology (Complutense University of Madrid). Initially, 30 semi-trained panellists participated in a triangle test to determine if potential probiotic cheeses containing lactobacilli differ in any aspect from the control cheese. Latter, 18 selected trained panellists were asked to perform a descriptive test for specific descriptors related to odour, flavour and taste, texture and appearance.

E. faecium LJx4 was assayed for inhibition of *Listeria innocua* SA1 during growth in 10% (wt/vol) HT-RSM. *Lc. lactis* ESI 153, a non-bacteriocin producer, was employed as control. Each of three batches (200 mL) of HT-RSM was inoculated with either *E. faecium* LJx4 ($\sim 8 \log_{10}$ cfu mL⁻¹), *Lc. lactis* ESI 153 ($\sim 8 \log_{10}$ CFU mL⁻¹) or *L. innocua* SA1 ($\sim 2.5 \log_{10}$ cfu mL⁻¹). Parallel, other two batches were co-inoculated with the indicated concentrations of *L. innocua* SA1 and either *E. faecium* LJx4 or *Lc. lactis* ESI 153. Each batch was distributed in tubes (20 mL) that were maintained at 30°C for 16 h. The pH and bacterial counts were determined at 0, 4, 8, 12 and 16 h. Enterococcal counts were determined on Kanamycin Aesculin Azide (KAA; Oxoid) agar plates incubated at 37°C for 24 h, lactococcal counts on GM17 agar plates incubated at 32°C for 24 h, and *Listeria* counts on PALCAM agar plates (BioMérieux, Marcy L'Etoile, Francia) incubated at 32°C for 48 h.

To test the anti-*Listeria* activity of *E. faecium* LJx4 in cheese, four vats were inoculated with *E. faecium* LJx4 (1%); two of them were co-inoculated with *L. innocua* SA1 ($3 \log_{10}$ cfu mL⁻¹) while the remaining two served as controls. Similarly,

other four vats were inoculated with *Lc. lactis* ESI 153 (1%); two of them were co-inoculated with *L. innocua* SA1 ($\sim 3 \log_{10}$ cfu mL⁻¹), and two served as controls. Finally, two vats were inoculated only with *L. innocua* SA1 ($\sim 3 \log_{10}$ cfu mL⁻¹). Cheeses were processed as described before and enterococcal, lactococcal and *Listeria* counts were determined.

Viable bacterial counts were recorded as cfu/mL or cfu/g and transformed to decimal logarithmic values. The experimental results are presented as mean values and standard deviations. The normality of data, homogeneity and independence of variance were checked before analysis. The significance of differences between means was assessed using a one-way or multifactorial analysis of variance, followed by the Scheffe test to compare means. Non parametric Kruskal-Wallis tests or Tukey multiple range tests were used when variables failed the above mentioned statistical assumptions. Level of significance was set at $P < 0.05$. StatGraphics Centurion XVI version 16.1.15 (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, Virginia, USA) was used to perform these analyses.

XIII.4 RESULTS

4.1. Basic technologic properties of bacteria isolated from human milk

In this PhD Thesis, some technological relevant properties for the dairy industry of a collection of 36 bacterial strains (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, and *Bifidobacterium*) isolated from human milk were tested. A high variability was found in relation to the acidifying, proteinase, aminopeptidase and esterase activities. Globally, most of the strains LAB and bifidobacteria acidified milk although five of them failed to produce acid. *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis* and *Lactococcus lactis* strains had a high acidifying activity but their acid production was lower than that of strains isolated from dairy products, such as cheese and commercial probiotic fermented milk.

The most proteolytic strains were found among *E. faecalis*; *Lactobacillus* strains had intermediate but highly variable values for proteolytic activity while the rest of the strains (staphylococci, two bifidobacteria and one lactococci) had scarce or no capability to hydrolyze casein. Regarding aminopeptidase activities, *S. salivarius* ZL49-18 exhibited the most intense peptidase activity with all the substrates assayed; its activity was comparable to that of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32, a strain used commercially as an adjunct culture in cheesemaking. Other *S. salivarius* and some *L. salivarius* strains displayed intense activity with some of the aminopeptidase substrates. In general, esterase activity was low among all strains assayed, except for streptococci and *L. gastricus* strains; enterococci and other lactobacilli showed very low esterase activity, similarly to what was observed among strains isolated from other sources. Globally, the differences in the technological properties that were analyzed could be related to the bacterial taxonomic group rather than to their origin (human milk vs. other sources).

4.2. Characterization of *L. gastricus* strains

Some technological (ability to grow in milk, acidifying activity, some enzymatic activities) and potentially probiotic (antimicrobial potential, resistance to the transit through the digestive tract) properties, as well as other properties related to their safety (production of biogenic amines, antibiotic resistance) and storage stability were studied in a collection of *L. gastricus* strains isolated from human milk in order to evaluate their potential application in the dairy industry. A high variability among the strains was observed in most of the properties studied. None of the strains led to milk coagulation after 24 h at 30°C, and their proteolytic activity was scarce. The highest aminopeptidase activities were those targeting Gly-Pro-pNA, and the preferred substrates for esterase activity were propionate and butyrate. Most of the *L. gastricus* strains produced between 70 and 87% of the isomer L-lactic acid, and detectable amounts of acetic acid. The antimicrobial activity of *L. gastricus* strains was not

related to the production of bacteriocins or hydrogen peroxide. These strains resisted the conditions of the gastrointestinal tract when vehiculated in milk, were able to adhere to porcine mucin, and did not produce biogenic amines in the conditions tested. Most of them were susceptible to clinically relevant antibiotics but the MIC's values for three strains were above the corresponding cut-off values for erythromycin, streptomycin and/or kanamycin for heterofermentative lactobacilli. The stability of *L. gastricus* strains was good during a six-month period at -20 or -80°C or 3°C after freeze-drying but deficient when freeze-dried preparations were kept at room temperature (~25°C).

4.3. Genome sequence of *L. gastricus* PS3

The initial draft assembly after the whole-genome sequencing of *L. gastricus* PS3 generated 93 contigs that were reduced to 80 final ones after the semiautomatic annotation of the sequences. The draft genome of *L. gastricus* PS3 consists of 1,904,872 bases with an average G+C content of 41.8%. It contains a total of 1,269 protein-encoding sequences and 43 RNA-encoding sequences (40 tRNAs and 3 rRNAs). Putative genes coding for transport systems and enzymes related to utilization of diverse carbohydrates (fructose, galactitol, mannose, lactose, cellobiose, sucrose, and β -glucosides) were identified. More than 20 proteases and peptidases and several peptide transporter genes were predicted, and genes encoding two putative esterases and a GDSL lipolytic enzyme were also found. Complete sequence for three glutamate-cysteine ligases and one glutamate decarboxylase were identified.

4.4. Relationship between the genome and some phenotypical properties of *L. fermentum* CECT 5716

Lactobacillus fermentum is a heterofermentative species that is found as a frequent inhabitant of the human gastrointestinal tract. The genome of *L. fermentum* CECT 5716 was recently sequenced (Jiménez *et al.*, 2010) and the relationship between the genetic background of the strain and certain phenotypic traits was assessed in this PhD Thesis. *L. fermentum* CECT 5716 does not contain plasmids and showed neither bacteriocin nor biogenic amines biosynthesis ability. However, it was able to produce high concentrations of organic acids, including both L- and D-lactic acid enantiomers and acetic acid. It was able to synthesize relatively high amounts of glutathione. A total of four genes encoding putative proteins with glutamate-cysteine ligase activity, that catalyzes the condensation of L-glutamate and L-cysteine, and one displaying glutathione synthetase activity, which would allow glutathione synthesis were found in the genome of *L. fermentum* CECT 5716. This strain produced both vitaminis B₂ and B₆, and the corresponding genetic information was identified in its chromosome; but it did not produce cyanocobalamin, and no gene involved in the biosynthesis of this vitamin could be found in its genome. No prophages could be induced and the strain was sensitive to all antibiotics proposed by EFSA standards

while no transmissible genes potentially involved in antibiotic resistance were detected in its genome. Finally, *L. fermentum* CECT 5716 was found to moderately stimulate the maturation of mouse dendritic cells. Comparison with the genome of *L. fermentum* IFO3956 revealed the presence of 15 protein-encoding genes that were only found in that of *L. fermentum* CECT 5716. Globally, there was an agreement between the phenotype properties of *L. fermentum* CECT 5716 and the genetic information contained in its genome.

4.5. A potential probiotic cheese made using *L. salivarius* CECT 5713 and *L. salivarius* PS2

The performance of two *Lactobacillus salivarius* strains (CECT 5713 and PS2), previously isolated from human milk and shown to have remarkable probiotic potential, was evaluated during production and storage of fresh cheese for 28 days at 4°C. Both *L. salivarius* strains remained viable in the cheeses throughout the storage period and a significant reduction in their viable counts was only observed after 21 days. The DGGE profiles indicated that the inoculated strains (*Lc. lactis* ESI 153 as starter and *L. salivarius* CECT 5713 or *L. salivarius* PS2 as probiotic) were the predominant in the respective cheeses during storage. Globally, the addition of the *L. salivarius* strains did not change significantly the gross chemical composition, pH and water activity of the cheese. Texture parameters (cohesiveness, adhesiveness, springiness, gumminess and chewiness) were similar in control and *L. salivarius*-containing cheeses after the storage period, although cheeses manufactured with *L. salivarius* CECT 5713 presented significantly higher hardness values. A total of 59 volatile compounds were identified in the headspace of experimental cheeses, including aldehydes, ketones, alcohols, esters, alkanes and fatty acids, and some *L. salivarius*-associated differences could be identified. All cheeses presented good results of acceptance after the sensory evaluation. Globally, our results indicated that fresh cheese can be a good vehicle for the two *L. salivarius* strains analyzed in this study.

4.6. Dairy technological properties of *Enterococcus faecium* LJx4

Finally, a variety of biochemical properties of *Enterococcus faecium* LJx4, also isolated from human milk, were analyzed. Its acidifying capacity and proteolytic activity were low compared to other dairy enterococcal and lactococcal strains but, in contrast, remarkable peptidase and esterase, although no lipase, activities were observed. The volatile profiles detected from cheeses manufactured with *E. faecium* LJx4 or the starter strain *Lc. lactis* ESI 153 were identical, but important differences were found in the concentration of individual compounds. Ethanol and 3-hydroxy-2-butanone were the most abundant volatile compounds found in experimental model cheese manufactured with *E. faecium* LJx4. This strain inhibited the growth of several *Listeria monocytogenes* and *L. innocua* strains *in vitro*. Although *E. faecium* LJx4 controlled *Listeria* growth in model fermented milk and cheeses manufactured from

milk inoculated with *L. innocua* SA1 ($2.5\text{--}3 \log_{10} \text{ cfu mL}^{-1}$), it led to a lower reduction in *Listeria* counts when it was compared with *Lc. lactis* ESI 153. In conclusion, these results indicate that *E. faecium* LJx4 could be useful as adjunct and/or bioprotective culture in dairy products.

XIII.5 DISCUSSION

5.1 Technological potential of a collection of bacteria isolated from human milk

In this PhD Thesis, several properties of some bacterial strains isolated from human milk were studied in order to evaluate the potential application in the dairy industry. Globally, notable intra- and interspecific variation in the technological properties (acidification, proteolysis and peptidase and esterase activities) analyzed in this work was registered among the human milk bacteria. It is common to observe a high interspecies variability when studying technological properties in “wild” strains such as those isolated from raw milk and artisan cheese. Actually, these sources have been repeatedly explored to isolate bacteria displaying novel properties that would allow the development of new starter, adjunct or, even, probiotic cultures for the dairy industry (Ayad *et al.*, 1999; Bozoudi *et al.*, 2015; Cogan *et al.*, 1997; Piraino *et al.*, 2008). This is considered to be a good option for improving industrial fermented dairy products which are often manufactured with pasteurized milk and standardized commercial starter cultures and, therefore, usually display mild sensory characteristics (Van Hoorde *et al.*, 2010).

The primary function of starter LAB in dairy fermented products is to produce high amounts of lactic acid that will lead to milk acidification provoking textural changes in milk and inhibiting the growth of spoilage microorganisms (Beresford and William, 2003). Therefore, the fast production of acid and proteolytic activity to allow the adequate growth in milk are usually considered the main selection criteria for starter cultures in dairy industry (Cogan *et al.*, 1997; Settani and Moschetti, 2010). In general, low acid production was found among strains isolated from human milk in this study. Actually, good acidifying activity is an infrequent trait among lactococci isolated from artisan dairy products (Cogan *et al.*, 1997). However, the ability of *S. salivarius* to produce acid at 30°C at rates comparable with *S. thermophilus* may be of interest for starter cultures.

LAB displaying low acidifying and proteolytic activities may be useful as adjunct cultures in dairy industry because they may promote product differentiation, specifically in short-ripened products, due to increased proteolytic activity that potentiates flavor development (Braghieri *et al.*, 2015; Crow *et al.*, 2001; Georgieva *et al.*, 2009). Globally, *S. salivarius* and *L. salivarius* strains isolated from human milk displayed high peptidase and esterase activities. Strains of *S. salivarius* and *L. salivarius* are good probiotic candidates but they are not usually found in fermented foods (Walter, 2008). Initial characterization of several basic technological properties in bacterial species usually not related to the dairy industry could be of interest to explore its potential to develop novel functional foods or, alternatively, discover distinct starter or adjunct cultures for dairy fermentations. This is the case of some human strains of *S. salivarius* and *L. salivarius* such as those assayed in this study. The

relevant peptidase and esterase activities of human strains belonging to both species may encourage studying their impact as adjunct cultures to improve the flavor of fermented dairy products.

5.2 *Lactobacillus gastricus*, a new actor in the dairy industry

Among the collection of bacteria isolated from human milk, *L. gastricus* strains were particularly appealing since this species is widely unknown at present. *L. gastricus* strains were poor milk acidifiers but this may be a desirable trait in adjunct cultures. Their proteolytic activity was comparable to that of commercial probiotic *Lactobacillus* added to cheese and *Lactococcus* and *Enterococcus* isolated from artisanal cheeses (Delgado *et al.*, 2002; Ong *et al.*, 2007).

On the other hand, LAB metabolic activity in fermented dairy products also contributes to flavor, texture, nutritional value, bioactive properties and microbiological safety of fermented dairy products (Settani and Moschetti, 2010). In addition to a general aminopeptidase activity, the *L. gastricus* strains exhibited high X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase (XPDAP) activity, needed to degrade caseins and bitter proline-rich oligopeptides derived from the action of cell wall proteinases on caseins. LAB esterases usually prefer C4 and/or C6 fatty acid derivatives, in agreement with the results obtained in this PhD Thesis (Holland *et al.*, 2005). Short chain fatty acids have a relatively high flavor perception threshold (ppm levels) and impart cheesy notes, especially butyric acid (Walstra and Jenness, 1984). Low levels of short chain fatty acid-derived esters, that have a lower flavor perception threshold (ppb levels), also contribute positively to cheese flavor, imparting a fruity aroma (Liu *et al.*, 2004).

The ability to control the growth of undesirable microorganisms is relevant in food fermentations (Gálvez *et al.*, 2010). The *L. gastricus* strains inhibited the growth of all the indicator organisms tested likely associated to the production of organic acids (lactic and/or acetic acid) since production of other antimicrobial compounds, such as bacteriocins or H₂O₂, was not detected in this study.

L. gastricus strains survived in the presence of up to 0.5% porcine bile salts, and displayed the capacity to adhere to mucus *in vitro*. Therefore, they showed potential to colonize the gastrointestinal tract (O'Sullivan *et al.*, 2005).

Respect to antibiotic resistance, three out of seven *L. gastricus* strains assayed showed MIC values higher than the breaking points established for *Lactobacillus* hterofermentative for kanamycin (64 µg mL⁻¹), streptomycin (128 µg mL⁻¹) and erythromycin (1 µg mL⁻¹) (EFSA, 2012). Inherent resistance to amynoglucosides, such as kanamycin and streptomycin, due to failure of antibiotic transport, and a possible intrinsic resistance to vancomycin related with peptidoglycan structure, is common among lactobacilli species (Elkins and Mullis, 2004; Gueimonde *et al.*, 2013). None of the studied strains had β-glucuronidase activity or capability of forming biogenic amines.

Refrigeration, freezing and freeze-drying are the most common preservation technologies applied for industrial concentrated preparation of microorganisms, either starter, adjunct, bioprotective or probiotic cultures. The ability of *L. gastricus* strains to survive during cold storage at 8 and 3°C was limited, but frozen storage at -20 or -80°C determined a high viability for up to six months. Freeze-drying was satisfactory, even though only NFDM was used as cryoprotectant.

The singular source of these strains, milk of healthy women, as well as some of their biological, technological and functional attributes, is attractive. Currently, *L. gastricus* is not included in the list of QPS taxonomic units but this list is open to new incorporations (EFSA, 2009; 2012; EFSA BIOHAZ Panel, 2014). Additional studies on the performance *L. gastricus* are required to confirm their potential for dairy industry and applications. However, the availability of the complete genome sequence of *L. gastricus* PS3 would allow gaining a deeper knowledge of its technological and probiotic properties.

5.2. *Lactobacillus fermentum*: agreement between phenotype properties and genome

L. fermentum CECT 5716 was able to produce lactic acid and acetic acid but production of bacteriocins or hydrogen peroxide could not be detected; in fact, its genome did not contain genes or gene clusters involved in the biosynthesis of antimicrobial substances other than organic acids. Thus, production of such acids and/or exclusive competition processes may be responsible for the antimicrobial activity of this strain (Martín *et al.*, 2005a; Olivares *et al.*, 2006). *L. fermentum* CECT 5716 showed a particularly high α -galactosidase activity which offers interesting perspectives in LAB application as vectors for delivery of digestive enzymes (LeBlanc *et al.*, 2008).

This study confirmed that *L. fermentum* CECT 5716 is able to produce glutathione, a fact previously described (Perán *et al.*, 2006) but uncommon among lactobacilli, which was related to the presence of genes involved in the biosynthesis of this antioxidant compound. Glutathione actively participates in the antioxidant mechanisms of the intestinal mucosa, preserving it from oxidant-induced tissue damage. Different studies have reported diminished glutathione content in inflammatory bowel diseases (Miralles-Barrachina *et al.*, 1999), and that glutathione supplementation results in beneficial effects in animals suffering experimentally-induced colitis (Loguercio *et al.*, 2003).

Traditionally, LAB have been considered consumers of group B vitamins but several studies have reported the strain-specific ability of some LAB to synthesize folate (Santos *et al.* 2008), riboflavin (Jayashree *et al.* 2011) and/or cobalamin (Martín *et al.* 2005b). *L. fermentum* CECT 5716 produced riboflavin and folate but not cobalamin. The contribution of the microbiota to the folate requirements of the high cell turnover intestinal epithelium is unknown but a mechanism for luminal folate

absorption by cells in the human colon has been reported (Dudeja *et al.* 2001), which suggests that folate produced *in situ* by the colonic microbiota may be utilized by cells in the colonic epithelium.

Antibiotics MIC values were lower or equal to the microbiological breakpoints established by the EFSA (2012), and were within the susceptible ranges reported elsewhere (Egervarn *et al.* 2007). Several predicted coding sequences were classified as putatively related with antibiotic resistance using the RAST server (<http://rast.nmpdr.org/>). However, none of these genes correlated with a clear antibiotic resistance phenotype. Globally, no transmissible antibiotic-resistance gene could be detected in the *L. fermentum* CECT 5716 genome and, therefore, this strain can be considered as safe from this point of view.

Globally, the results of this work provide some clues on the relationship between some phenotypic properties of *L. fermentum* CECT 5716 and their subjacent molecular basis. *In silico* analysis has shown to be effective in predicting specific beneficial properties of this probiotic bacterium since all of the evaluated phenotypes were correlated with the presence of the genes or gene clusters involved. Functional genomics pave the way for the evaluation and search for novel probiotic strains or to understand the mechanisms by which these microorganisms provide benefits to their hosts.

5.3. Cheese as a vehicle for delivering probiotic *L. salivarius* strains

Cheese has been considered as an excellent alternative to fermented milk and yogurts as a vehicle for probiotic delivery. Its buffering capacity is one of its advantages because it protects probiotics against the acidic stomach environment. The structure of the gel and its high fat content and solid consistency also add to the probiotic protection (Cruz *et al.*, 2009; Ong *et al.*, 2006). Several studies have demonstrated that cheese is an excellent carrier for probiotic bacteria (Vinderola *et al.*, 2000; Ong *et al.*, 2007). However, variable results have been obtained with different probiotic strains and each strain should be tested individually.

Theoretically, the probiotic bacteria could be added either directly to milk and/or incorporated at a later stage during the manufacture of cheese, because there may be some loss of probiotic in whey (Ong *et al.*, 2006). In preliminary assays performed during this PhD Thesis, *L. salivarius* CECT 5713 and *L. salivarius* PS2 were also co-cultured with the starter culture but only a small amount of probiotic was retained in the curd, resulting in a high loss of lactobacilli in the cheese whey (results not shown). Notably, the addition of the probiotic lactobacilli to the curds after whey drainage, and before molding, resulted in improved retention of lactobacilli in the cheese. In order to have industrial application, the incorporated probiotic strain must maintain its viability during the manufacture and through the shelf life of the product. In this PhD Thesis, both *L. salivarius* strains remained viable in the experimental cheeses after 28 days at 4°C and the hygienic quality of the final product was adequate. Antibacterial properties

have been reported for *L. salivarius* CECT 5713 due to the production of antimicrobial compounds such as lactate, acetate and hydrogen peroxide (Martín *et al.*, 2006).

A minimum probiotic daily dose of 10^8 – 10^9 cfu has been recommended in processed foods in order to exert their beneficial effects (Cruz *et al.*, 2009; Talwalkar *et al.*, 2004). This would be equivalent to a daily intake of 100 g of product containing 10^6 – 10^7 cfu/g. The results obtained in this PhD Thesis show that the counts of *L. salivarius* CECT 5713 and *L. salivarius* PS2 in cheeses were always in the range of this recommended level and would satisfy this criteria. Furthermore, the presence of these potentially probiotic bacteria did not interfere with the performance of starter lactococci, as it has been described by other authors, and did not result in a substantial change of the fresh cheese composition (Ong *et al.*, 2007).

Instrumental methods only detected differences in hardness but this difference was not perceived by the panellists during the descriptive test, indicating that the addition of probiotic *L. salivarius* CECT 5713 and *L. salivarius* PS2 did not have a relevant impact in the sensory quality and acceptance of the cheese. The main change detected in the volatile compounds profile was a higher acetic acid concentration in the cheeses containing the *L. salivarius* strains, probably related to a higher lactose degradation during cheese storage. However, these differences did not impact the sensory perception given by the panellists or the global acceptance of the cheeses manufactured with *L. salivarius*, as it has been described with other probiotic strains (Ong *et al.*, 2006; Buriti *et al.*, 2005).

5.4. Dairy technological properties of *E. faecium* LJx4

Industrial practice nowadays aims to tightly control the fermentation process and to get uniform and consistent fermented products that are frequently described as having bland uniform organoleptic properties and lacking attractiveness. In this context, it would be desirable to find new strains to increase the biodiversity, as well as to diversify and develop desired and/or distinct characteristics in fermented foods (Cogan *et al.*, 2007; Peláez and Requena, 2005). An increasing number of enterococcal strains display desirable technological properties, including bacteriocin production and probiotic properties (Foulquié Moreno *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 2011).

E. faecium LJx4 can be considered as a poor milk acidifier and did not exhibit relevant proteolytic activity but this behaviour is usually found among LAB not related to dairy commercial starter cultures (Ayad *et al.*, 2000; Psoni *et al.*, 2006). However, there is an increasing interest in the search for and selection of strains contributing to enhance cheese flavour, which is linked to enzymatic breakdown of milk protein and fat. Precisely, enterococci play a key role in the maturation and flavour development in many cheeses from Southern Europe (Franz *et al.*, 2003; Foulquié Moreno *et al.*, 2006).

The screening of bacterial strains from natural niches, and their combination with industrial strains if required, has been claimed as an interesting possibility for the

development of custom-made starter cultures because they have been found to produce unusual flavour components and/or profiles (Smit *et al.*, 2005). In this sense, cheese manufactured with *E. faecium* LJx4 had five-fold the concentration of acetoin and ten-fold that of ethanol, a fact that could lead to cheese with buttery, alcoholic and floral notes (Molimard and Spinnler, 1996).

E. faecium LJx4 had anti-*Listeria* activity *in vitro*, albeit the production of bacteriocins could not be confirmed in the assayed conditions. The population of *L. innocua* SA1 was controlled by *E. faecium* LJx4 in both types of products, although not as efficiently as *Lc. lactis* ESI 153, a strain that attained a higher population level and lower pH values in the product, and a higher amount of acetic acid. Globally, the results obtained in this work suggest a bacteriostatic action of *E. faecium* LJx4 against *L. innocua* SA1, which may be effective for *Listeria* control when combined with other environmental barriers or bacteria. In fact, complex microbial consortiums display a higher bacteriostatic effect against *L. monocytogenes* than a starter culture alone in cheese, although the exact mechanism of the antilisterial action and the microbial interactions remain unknown (Callon *et al.*, 2014).

XIII.6 CONCLUSIONS

The conclusions obtained in this PhD Thesis are the following:

First. The evaluation of the technological properties of a collection of strains, isolated from human milk, including members of the genera *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* showed that those belonging to the species *Streptococcus salivarius* and *Enterococcus faecalis* displayed the highest acidifying activity. The *Enterococcus faecalis* strains were the most proteolytic ones while those of *Staphylococcus salivarius* and *Lactobacillus salivarius* showed remarkable peptidase and esterase activities.

Second. The *Lactobacillus gastricus* strains characterized in this PhD Thesis show attractive properties to be used in the manufacture of dairy products

Third. Sequencing and annotation of the genome of *Lactobacillus gastricus* PS3 genome confirms its potential for its application in the production of dairy products.

Fourth. There is a good relationship between the functional and safety phenotype properties of *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 and the genetic information contained in its genome.

Fifth. *Lactobacillus salivarius* CECT 5713 and *L. salivarius* PS2, two probiotic strains isolated from human milk, survived during the production and storage of fresh cheese for 28 days at 4°C, did not interfere with normal growth of the starter culture and did not modify significantly the composition, organoleptic properties and overall consumer acceptance of the probiotic cheeses. As a consequence, fresh cheeses can be a good vehicle for delivery of both strains.

Sixth. *Enterococcus faecium* LJx4, a safe strain previously isolated from human milk, could be useful as adjunct and/or bioprotective culture in the dairy industry because it displays poor acidifying and proteolytic activities, changes the volatile composition in cheese and shows anti-*Listeria* activity both *in vitro* and the food model.

XIII.7 REFERENCES

- Aureli, P., Capurso, L., Castellazzi, A.M., Clerici, M., Giovannini, M., Morelli, L., Poli, A., Pregliasco, F., Salvini, F., Zuccotti, G.V. 2011. Probiotics and health: an evidence-based review. *Pharmacological Research: The Official Journal of The Italian Pharmacological Society*. 63: 366-376.
- Abeijón Mukdsi, M., Medina, R., Katz, M., Pivotto, R., Gati, P., González, S.N. 2009. Contribution of lactic acid bacteria esterases to the release of fatty acids in miniature ewe's milk cheese models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 1036-1044.
- Ayad, E.H.E., Verheul, A., Wouters, J.T.M., Smit, G. 2000. Application of wild starter cultures for flavour development in pilot plant cheese making. *International Dairy Journal*. 10: 169-179.
- Beresford, T., Williams, A. 2004. The microbiology of cheese ripening. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (eds.). Academic Press.1: 287-317.
- Bover-Cid, S., Holzapfel, W.H. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*. 53: 33-41.
- Buriti, F.C.A., Da Rocha, J.S., Saad, S.M.I. 2005. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *International Dairy Journal*. 15: 1279-1288.
- Callon, C., Retureau, E., Didienné, R., Montel, M.C. 2014. Microbial biodiversity in cheese consortia and comparative *Listeria* growth on surfaces of uncooked pressed cheeses. *International Journal of Food Microbiology*. 174: 98-109.
- Carr, F.J., Chill, D., Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28: 281-370.
- Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H., Catignani, G.L. 1983. Spectrophotometric assay using *o*-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*. 66: 1219-1227.
- Cohen, P.S., Laux, D.C. 1995. [24] Bacterial adhesion to and penetration of intestinal mucus in vitro. *Methods in enzymology*. 253: 309-314.
- Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P.S., Fernandes, I., Gomez, J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Antonio Ledda, A., Medina, M., Rea, M.C., Rodriguez, E. 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*. 64: 409-421.

Cogan, T.M., Beresford, T.P., Steele, J., Broadbent, J., Shah, N.P., Ustunol, Z. 2007. Invited Review: Advances in starter cultures and cultured foods. *Journal of Dairy Science*. 90: 4005-4021.

Cruz, A., Buriti, F.C., Souza, C. H., Faria, J.A., Saad, S.M. 2009. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science and Technology*. 20: 344-354.

Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H., Catignani, G.L. 1983. Spectrophotometric assay using *o*-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*. 66: 1219-1227.

Delgado, S., Delgado, T., Mayo, B. 2002. Technological performance in milk of several lactococci and enterococci strains of dairy origin. *Journal of Food Protection*. 65: 1590-1596.

Doyle, M.P., Steenson, L.R., Meng, J. 2013. Bacteria in food and beverage production. Chapter 8. In *The Prokaryotes-Applied Bacteriology and Biotechnology*. Rosenberg et al. (eds.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 241-256.

Douillard, F.P., de Vos, W.M. 2014. Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. *Microbial Cell Factories*.13: 1-21.

Dudeja, P.K., Kode, A., Alnounou, M., Tyagi, S., Torania S., Subramanian V.S., Said H.M. 2001. Mechanism of folate transport across the human colonic basolateral membrane. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 281: G54-G60.

EFSA. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). 2009. Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed (2009 update). *EFSA Journal*. 7: 1431.

EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), 2014. Statement on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 1: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until October 2014. *EFSA Journal* 2014;12(12):3938.

EFSA. 2012. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*.10: 2740

Egervarn, M., Danielsen, M., Roos, S., Lindmark, H., Lindgren, S. 2007. Antibiotic susceptibility profiles of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Food Protection*. 70: 412-418.

Elsser-Gravesen, D., Elsser-Gravesen, A. 2014. Biopreservatives. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*. 143: 29-49.

Elkins, C.A., Mullis, L.B. 2004. Bile-mediated aminoglycoside sensitivity in *Lactobacillus* species likely results from increased membrane permeability

attributable to cholic acid. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 7200-7209

Fellis, G.E., Dellaglio, F. 2007. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. 8: 44-61.

FAO/WHO, "Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria," Technical Report, FAO/WHO, Geneva, Switzerland, 2001.

Fernandez, L., Langa, S., Martin, V., Maldonado, A., Jimenez, E., Martin, R., Rodríguez, J.M. 2013. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*. 69:1-10.

Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Muñoz-Quesada, S., Gil, A. 2013. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*. 109: S35-S50.

Foulquié Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. 106: 1-24.

Franz, C.M., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapfel, W.H. 2003. Enterococci in foods: a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 88: 105-122.

Franz, C. M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., Gálvez, A. 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 151: 25-140.

Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L., Ben Omar, N. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*. 120: 51-70.

Gálvez, A., Abriouel, H., Benomar, N., Lucas, R. 2010. Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. *Current Opinion in Biotechnology*. 21: 142-148.

Grimaldi, A., Bartowsky, E., Jiranek, V. 2005. Screening of *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. for glycosidase activities that are important in oenology. *Journal of Applied Microbiology*. 99: 1061-1069.

Gueimonde, M., Sánchez, B., Clara, G., Margolles, A. 2013. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 4: 202

Heikkilä, M.P., Saris, P.E.J. 2003. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *Journal of Applied Microbiology*. 95: 471-478.

Heilig, H.G., Zoetendal, E.G., Vaughan, E.E., Marteau, P., Akkermans, A.D.L., de Vos, W.M. 2002. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 114-123.

Holland, R., Liu S.-Q., Crow, V.L., Delabre, M.-L., Lubbers, M., Bennett, M., Norris, G. 2005. Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. *International Dairy Journal*. 15: 711-718.

Jayashree, S., Rajendhran, J., Jayaraman, K., Kalaichelvan, G., Gunasekaran, P. 2011 Improvement of riboflavin production by *Lactobacillus fermentum* isolated from yogurt. *Food Biotechnology*. 25: 240-251.

Jiménez, E., Fernández, L., Maldonado, A., Martín, R., Olivares, M., Xaus, J., Rodríguez, J.M. 2008. Oral administration of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 4650-4655.

Jiménez, E., Langa, S., Martín, V., Arroyo, R., Martín, R., Fernández, L., Rodríguez, J.M. 2010. Complete genome sequence of *Lactobacillus fermentum* CECT 5716, a probiotic strain isolated from human milk. *Journal of Bacteriology*. 192: 4800-4800.

LeBlanc, J.G., Ledue-Clier, F., Bensaada, M., de Giori, G.S., Guerekobaya, T., Sesma, F., Juillard, V., Rabot S., Piard, J.C. 2008. Ability of *Lactobacillus fermentum* to overcome host alpha-galactosidase deficiency, as evidenced by reduction of hydrogen excretion in rats consuming soya alpha-galactooligosaccharides. *BMC Microbiology*. 8: 22.

Lee, J.H., Diono, R., Kim, G.Y., Min, D.B. 2003. Optimization of solid phase microextraction analysis for the headspace volatile compounds of Parmesan cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 1136-1140.

Leroy, F., de Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*. 15: 67-78.

Liu, S.Q., Holland, R., Crow, V.L. 2004. Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. *International Dairy Journal*. 14: 923-945.

Loguercio, C., D'Argenio, G., Delle Cave, M., Cosenza, V., Della Valle, N., Mazzacca, G., Blanco, C.D.V. 2003. Glutathione supplementation improves oxidative damage in experimental colitis. *Digestive and Liver Disease*. 35: 635-641.

Magnusson, J., Schnürer, J. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 1-5.

Marín, M.L., Arroyo, R., Jiménez, E., Gómez, A., Fernández, L., Rodríguez, J.M. 2009. Cold Storage of human milk: effect on its bacterial composition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 49: 343-348.

Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M.L., Xaus, J., Fernández, L., Rodríguez, J.M. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of Pediatrics*. 143: 754-758.

Martín, R., Olivares, M., Marín, M.L., Fernández, L., Xaus, J., Rodríguez, J.M. 2005a. Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. *Journal of Human Lactation*. 21: 8-17.

Martín, R., Olivares, M., Marín, M.L., Xaus, J., Fernández, L., Rodríguez, J.M. 2005b. Characterization of a reuterin-producing *Lactobacillus coryniformis* strain isolated from a goat's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 104: 267-277.

Martín, R., Jiménez, E., Olivares, M., Marín, M.L., Fernández, L., Xaus, J., Rodríguez, J.M. 2006. *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. *International Journal of Food Microbiology*. 112: 35-43.

Martín, R., Heilig, G.H.J., Zoetendal, E.G., Smidt, H., Rodríguez, J.M. 2007. Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *Journal of Applied Microbiology*. 103: 2638-2644.

Martín, R., Jiménez, E., Heilig, H., Fernández, L., Marín, M.L., Zoetendal, E.G., Rodríguez, J.M. 2009. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 75: 965-969.

Martín, V. 2011. Interacciones entre la microbiota de la leche humana y el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1). PhD dissertation. Universidad Complutense de Madrid.

Martín, V., Maldonado-Barragán, A., Moles, L., Rodríguez-Baños, M., Campo, R.D., Fernández, L., Rodríguez, J.M., Jiménez, E. 2012. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *Journal of Human Lactation*. 28: 36-44.

Miralles-Barrachina, O., Savoye, G., Belmonte-Zalar, L., Hochain, P., Ducrotte, P., Hecketsweiler, B., Lerebours, E., Dechelotte, P. 1999. Low levels of glutathione in endoscopic biopsies of patients with Crohn's colitis: the role of malnutrition. *Clinical Nutrition*. 18:313-317.

Moles, L., Gómez, M., Heilig, H., Bustos, G., Fuentes, S., de Vos, W., Fernández, L., Rodríguez, J.M., Jiménez, E. 2013. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PLoS One*. 8: Article ID e66986.

Molimard, P., Spinnler, H.E. 1996. Review: Compounds involved in the flavour of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. *Journal of Dairy Science*. 79: 169-184.

Moll, G.N., Konings, W.N., Driessen, A.J.M. 1999. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76: 185-198.

Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W., Backhaus, H. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*. 178: 5636-5643.

Olivares, M., Díaz-Ropero, M.P., Martín, R., Rodríguez, J.M., Xaus, J. 2006. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *Journal of Applied Microbiology*. 101:72-79.

Ong, L., Henriksson, A., Shah, N.P. 2006. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *International Dairy Journal*. 16: 446-456.

Ong, L., Henriksson, A., Shah, N.P. 2007. Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* and *Bifidobacterium* sp. *International Dairy Journal*. 17: 67-78.

O'Sullivan, G.C., Kelly, P., O'Halloran, S., Collins, C., Collins, J.K., Dunne, C., Shanahan, F. 2005. Probiotics: an emerging therapy. *Current Pharmaceutical Design*. 11: 3-10.

Peláez, C., Requena, T. 2005. Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. *International Dairy Journal*. 15: 831-844.

Peran, L., Camuesco, D., Comalada, M., Nieto, A., Concha, A., Adrio, J.L., Olivares, M., Xaus, J., Zarzuelo, A., Galvez, J. 2006. *Lactobacillus fermentum*, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis. *International Journal of Colorectal Disease*. 21: 737-746.

Psoni, L., Kotzamanides, C., Andrighetto, C., Lombardi, A., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. 2006. Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Enterococcus* isolates from Batzos, a raw goat milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 109:109-120.

Reginensi, S.M., González, M.J., Bermúdez, J. 2013. Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from cow, ewe and goat dairy artisanal farmhouses. *Brazilian Journal of Microbiology*. 44: 427-430.

Reviriego, C., Eaton, T., Martín, R., Jiménez, E., Fernández, L., Gasson, M.J., Rodríguez, J.M. 2005. Screening of virulence determinants in *Enterococcus faecium* isolated from breast milk. *Journal of Human Lactation*. 21: 131-137.

Ruiz-Barba, J.L., Maldonado, A., Jiménez-Díaz, R. 2005. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Analytical Biochemistry*. 347: 333-335.

Santos, F., Vera, J.L., van der Heijden, R., Valdez, G., de Vos, W.M., Sesma, F., Hugenholtz, J. 2008. The complete coenzyme B12 biosynthesis gene cluster of *Lactobacillus reuteri* CRL1098. *Microbiology* .154: 81-93.

Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M.D., Rea, M.C., Lombardi, A., Cogan, T.M., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal*. 11: 621-647.

Settanni, L., Moschetti, G. 2010. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits, *Food Microbiology*. 27: 691-697.

Shiby, V.K., Mishra, H.N. 2013. Fermented milks and milk products as functional foods-a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 53: 482-96.

Smit, G., Smit, B.A., Engels, W.J.M. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*. 29: 591-610.

Song, Y-L., Kato, N., Matsumiya, Y., Liu, C-X., Kato, H., Watanabe, K. 1999. Identification of and hydrogen peroxide production by fecal and vaginal lactobacilli isolated from Japanese women and newborn infants. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 3062-3064.

Stiles, M.E., Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. 36: 1-29.

Talwalkar, A., Miller, C.W., Kailasapathy, K., Nguyen, M.H. 2004. Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*. 39: 605-611.

Vinderola, C.G., Prosello, W., Ghiberto, D., Reinheimer, J.A. 2000. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. *Journal of Dairy Science*. 83: 1905-1911.

Walstra, P., Jenness, R. 1984. *Dairy chemistry and physics*. New York: Willey, (Chapter 18).

Yap, P.S., Gilliland, S.E. 2000. Comparison of newly isolated strains of *Lactobacillus delbrueckii* susp. *lactis* for hydrogen peroxide production at 5°C. *Journal of Dairy Science*. 83: 628-632.

